

KRYOSÄILYTYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN PENSASHANHIKEILLE

Liisa Miettinen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2009

Teknologia



JYVÄSKYLÄN AMMATTIKORKEAKOULU
JAMK UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES



Tekijä(t) MIETTINEN, Liisa	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 7.12.2009
	Sivumäärä 63	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus ()	Verkkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi KRYOSÄILYTYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN PENSASHANHIKEILLE		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) MAURANEN, Ritva, lehtori		
Toimeksiantaja(t) MTT Kasvintuotannon tutkimus, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, vanhempi tutkija NUKARI, Anna, tutkija		
<p>Tiivistelmä</p> <p>Työn tavoitteena oli kehittää käyttökelpoinen kryosäilytysmenetelmä pensashanhikeille (<i>Dasiphora fruticosa</i> (L.) Rydb.). Opinnäytetyö tehtiin Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksella (MTT) Laukaassa. Laukaan toimipaikka kuuluu Kasvintuotannon tutkimus-yksikköön. Kryosäilytys eli nestetyppeen säilyttäminen tuli tarpeelliseksi, kun toimeksiantajan tuotannosta oli poistumassa kaksi pensashanhikkilajiketta ja niiden säilyttäminen kasvihuoneilla tai mikroviljelminä olisi aikaa ja tilaa vievää.</p> <p>Menetelmän optimoimiseen käytettiin neljän eri pensashanhikkilajikkeen <i>in vitro</i> -solukko viljelmistä eristettyjä silmuja. Koska Laukaassa on käytössä pisara-vitrifikaatio-menetelmä vadelmalla ja mansikalla, pensashanhikille kokeiltiin aluksi vadelma- ja mansikka-menetelmiä mukailevia menetelmiä ja lisäksi myöhemmin muutamia uusia menetelmiä, jotta paras menetelmä saataisiin valittua käyttöön. Optimoitavia muuttujia olivat menetelmän valinnan lisäksi silmun tyyppi ja koko, aktiivihiihen käyttö alustassa, sokerikäsittelyt, silmujen eristämispäivä ja tärkeimpänä vitrifikaatiokäsittely eli käsittelyaika vitrifikaatioliuoksissa.</p> <p>Työssä käsiteltiin kaikkiaan 20 erisuuruista koesarjaa ja eristettiin noin 1500 silmua. Silmut eristettiin joko maanantaina tai perjantaina. Maanantaina eristetyt silmut käsiteltiin pääasiassa mansikalle kehitellyn menetelmän mukaisesti ja perjantaina eristetyt silmut taas vadelmalle kehitellyn menetelmän mukaisesti. Paras lopputulos saavutettiin käyttämällä vadelmalle kehitettyä menetelmää mukailevaa pisara-vitrifikaatio-menetelmää, jossa otettiin kuitenkin 2–3 mm pitkiä kärkisilmuja. Silmujen koko ja tyyppi poikkesivat vadelmilla käytetyistä 0,5–2 mm pitkistä hankasilmuista. Silmuille annettiin kolmen päivän mittainen aktiivihiihikäsittely ja kokeiltiin menestyksellisesti alemmaa sokeripitoisuutta kuin vadelmalle käytetyssä menetelmässä. Vitrifikaatiokäsittelyssä parhaaseen tulokseen päästiin 60 minuutin PVS2-käsittelyajalla. Mansikalle kehitetty pisara-vitrifikaatio-menetelmä ei toiminut kaikilla pensashanhikeilla, minkä vuoksi sitä ei voida käyttää kryosäilytysmenetelmänä pensashanhikkeja säilytettäessä. Täydentävistä menetelmätestauksista saatiin selville, että pensashanhikit vaativat aktiivihiihikäsittelyn, mutta vadelmalle kehitetyssä menetelmässä käytetty korkea sokeripitoisuus oli pensashanhikeille haitallinen. Pensashanhikeille saatiin kehitettyä uusi, toimiva menetelmä, joka voitiin ottaa käyttöön.</p>		
Avainsanat (asiasanat) Mikrolisäys, kasvintuotanto, kylmänkestävyys, kryosäilytys, vitrifikaatio, aktiivihiihi		
Toimeksiantajan myöntämä raportin julkaisulupa		
Paikka Laukaa	Aika 7.12.09	Allekirjoitus MARJATTA UOSUKAINEN Nimenselvennös



Author(s) MIETTINEN, Liisa	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 7.12.2009
	Pages 63	Language Finnish
	Confidential ()	Permission for web publication (X)
Title DEVELOPMENT OF THE CRYOPRESERVATION METHOD FOR SHRUBBY CINQUEFOIL		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) MAURANEN, Ritva, Senior Lecturer		
Assigned by MTT Plant Production Research, Laukaa UOSUKAINEN, Marjatta, Senior Research Scientist NUKARI, Anna, Research Scientist		
<p>Abstract</p> <p>The aim of this work was to develop a functioning cryopreservation method for shrubby cinquefoil (<i>Dasiphora fruticosa</i> (L.) Rydb.). This thesis was carried out in MTT Agrifood Research Finland at Laukaa. The office of Laukaa is part of the Plant Production Research unit. Cryopreservation (preservation in liquid nitrogen) became necessary as two shrubby cinquefoil cultivars were cut out from the production. The maintenance of cultivars in a greenhouse or as <i>in vitro</i> cultures would be time and space demanding.</p> <p>To optimize the method, buds isolated from four <i>in vitro</i> cultures of shrubby cinquefoil were used. Since the droplet vitrification method is used at Laukaa for raspberry and strawberry, it was also tried out with shrubby cinquefoil. At first the methods that are in use with raspberry and strawberry were tested. In addition, some new methods were tried out. The best method would be taken into use. Variables that had to be optimized were the method selection, the bud type and size, the use of activated charcoal in the culture medium, sugar treatments, bud isolating days and as most important of all the vitrification treatment and times of treatments in vitrification solutions.</p> <p>In this work 20 test series of different sizes were processed and about 1500 buds were isolated. The buds were isolated either on Monday or on Friday. The buds isolated on Monday were mainly treated with the method developed for strawberries and the buds isolated on Friday were mainly treated with the method developed for raspberries. The best final result was reached by using the adapted droplet vitrification method that is developed for raspberry, but using apical buds of 2–3 mm length. It was different than in the method developed for raspberry where lateral buds of 0.5–2 mm length are being used. The buds were precultured in a culture medium with activated charcoal for three days and a lower sucrose concentration than used for raspberry method was successfully tried. In the vitrification treatment, the best result was obtained with 60 minute PVS2-treatment time. The method developed for strawberry did not work out with all shrubby cinquefoil cultivars and therefore it can not be used as cryopreservation method for them. From supplementary method testing it was obtained that shrubby cinquefoil needed an activated charcoal treatment, but the sucrose concentration used for raspberries was too high for it. A new, workable method was developed and could be taken into use.</p>		
Keywords Micropropagation, plant production, cold-hardiness, cryopreservation, vitrification, activated charcoal		
Commissioner's permission to publish this report		
Place Laukaa	Date 7.12.09	Signature Clarification MARJATTA UOSUKAINEN

SISÄLTÖ

KÄSITTEET JA LYHENTEET.....	4
1 OPINNÄYTETYÖN TAUSTA JA TAVOITTEET	5
2 PENSASHANHIKKIEN LISÄYS JA KASVUSOLUKOT	6
2.1. Pensashanhikit	6
2.2. Mikrolisäys ja kasvin kasvusolukot	8
3 KYLMÄNKESTÄVYYS JA KRYOSÄILYTYS	11
3.1. Kylmänkestävyys ja kryokestävyys	11
3.2. Kryosäilytysmenetelmät	18
4 TUTKIMUSAINESTO JA -MENETELMÄT	21
4.1. Pisara-vitrifikaatio-menetelmä	21
4.2. Tutkimuksen lähtökohdat	21
4.3. Koesarjat.....	23
5 TYÖN TOTEUTUSVAIHEET	24
5.1. Alkuvalmistelut	24
5.2. Esikasvatus	24
5.3. Silmujen eristäminen emokasvista	25
5.4. Sokerikäsittely	25
5.5. Vitrifikaatiokäsittely.....	26
5.6. Pakastus ja sulatus	27
5.7. Kasvin eloonjäämisen ja kasvuunlähdon havainnointi	28
6 TULOKSET	30
6.1. Yhteenveto kokeiden onnistumisesta	30
6.2. Kokeiden yleiskuva lajikkeittain	31
6.3. PVS2-ajan määrittäminen oikeaksi	39
6.4. Yhteenveto PVS2-ajan optimoinnista	40
6.5. Sokerien vaikutus	46
6.6. Aktiivihiiilen merkitys	47
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	48
7.1. Tutkimustulosten tarkastelua.....	48
7.2. Tutkimustulosten luotettavuus ja pätevyys	49
7.3. Menetelmäsuositus	52

7.4. Jatkotutkimukset.....	52
LÄHTEET	54
LIITTEET.....	56
Liite 1. Suomen kasvien menestymisvyöhykekartta	56
Liite 2. Koesarjat	57
Liite 3. Käytetyt luokset ja alustat.....	58
Liite 4. Kokeiden onnistuminen lajikkeittain	62
Liite 5. Kasvuunlähdöt lajikkeittain	63

KUVIOT

KUVIO 1. Pensashanhikit	8
KUVIO 2. Kasvin kärki- ja hankasilmut.....	11
KUVIO 3. Jään muodostuminen elävässä kasvisolussa.....	13
KUVIO 4. Pisara-vitrifikaatio-menetelmän suoritus	22
KUVIO 5. Maljakäsittelyt	27
KUVIO 6. Maljojen havainnointi.....	28
KUVIO 7. Erlenmeyerkolvien havainnointi.	29
KUVIO 8. 'Goldteppich' kärkisilmut pituus 2–3 mm ja PVS2-aika 45 minuuttia.....	32
KUVIO 9. 'Tervola' kärkisilmut pituus 2–3 mm ja PVS2-aika 45 minuuttia.	33
KUVIO 10. 'Elizabeth' kärkisilmut pituus 2–3 mm ja PVS2-aika 45 minuuttia.	34
KUVIO 11. 'Dart's Cream' kärkisilmut pituus 2–3 mm ja PVS2-aika 45 minuuttia.	35
KUVIO 12. Perjantaina eristettyjen silmujen lisäkokeiden tulokset.....	37
KUVIO 13. Maanantaina eristettyjen silmujen lisäkokeiden tulokset.....	38
KUVIO 14. Perjantaina eristettyjen silmujen kasvuunlähtö lajikkeittain	41
KUVIO 15. Maanantaina eristettyjen silmujen kasvuunlähtö lajikkeittain	41
KUVIO 16. 'Goldteppich'-lajikkeen perjantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset.	42
KUVIO 17. 'Goldteppich'-lajikkeen maanantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset.....	42
KUVIO 18. 'Tervola'-lajikkeen perjantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset.....	43
KUVIO 19. 'Tervola'-lajikkeen maanantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset	43
KUVIO 20. 'Elizabeth'-lajikkeen perjantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset.	44
KUVIO 21. 'Elizabeth'-lajikkeen maanantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset.....	44
KUVIO 22. 'Dart's Cream' -lajikkeen perjantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset.	45

KUVIO 23. 'Dart's Cream' -lajikkeen maanantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset	45
KUVIO 24. Sokerikäsittelyjen vaikutus.....	47

TAULUKOT

TAULUKKO 1. Jäänestoaineiden luokittelu	17
TAULUKKO 2. Yleisimpien kryosäilytysmenetelmien edut ja haitat	20

KÄSITTEET JA LYHENTEET

+LN-koe	koe, jossa silmut käsitellään nestemäisellä typellä
-LN-koe	koe, jossa silmuja ei käsitellä nestemäisellä typellä, mutta ne käyvät muuten läpi vitrifikaatiokäsittelyn niin kuin muutkin silmut
0-koe	koe, jossa silmut kulkevat muiden silmujen rinnalla erilaisilla maljoilla, mutta eivät käy vitrifikaatioliuoksissa eivätkä nestemäisessä typessä
AC	aktiivihiili
BAP	6-bentsyyliaminopuriini
DMSO	dimetyylisulfoksidi
HS	hankasilmu
IBA	indoli-3-voihappo
<i>in vitro</i>	elämistä lasissa; puhutaan <i>in vitro</i> -viljelmistä, kun kasvi kasvaa lasipurkissa laboratorio-olosuhteissa
kallus	kasvien aktiivisesti jakautuvaa, erilaistumatonta solukkoa, jota syntyy muun muassa kasvin haavoittuneisiin kohtiin
kryosäilytys	pitkäaikaissäilytysmenetelmä, jossa säilytettävä materiaali laitetaan nestetyyppeen (-196°C) tai nestetyypen kaasufaasiin (alle -150°C) ja otetaan uudelleen käyttöön tarvittaessa
KS	kärkisilmu
LS	(loading solution) latausliuos, ensimmäinen liuos vitrifikaatiokäsittelyssä
meristeemi	kasvin kasvusolukko, joka ei ole erikoistunut miksikään kasvinosaksi
mikrolisäys	kasvin lisäämistä aseptisesti laboratoriossa pienistä kasvin osista
PEG _{1000/6000}	polyetyleeniglykoli; alaindeksi kuvaa molekyyli­massaa
PVP	polyvinyyli­pyrrolidoni
PVS2	(plant vitrification solution 2), toinen liuos vitrifikaatiokäsittelyssä
vitrifikaatio	tapahtuma, jossa vesi muuttuu nestemäisestä olomuodostaan kiinteäksi, amorfiseksi ja lasimaiseksi, ja jääkiteitä ei muodostu pakastettaessa niin kuin tavallisessa jäänmuodostuksessa

1 OPINNÄYTETYÖN TAUSTA JA TAVOITTEET

MTT (Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus) on Suomessa maatalous- ja elintarviketutkimusta sekä maatalouden ympäristöntutkimusta tekevä laitos. Toiminta on maa- ja metsätalousministeriön alaista toimintaa. MTT:llä työskentelee noin 850 henkilöä ja toimipaikkoja on neljällätoista eri paikkakunnalla. Päätoimipaikka sijaitsee Jokioisissa. MTT:n tutkimus jakaantuu kuuteen eri tutkimusalaan, jotka ovat biotekniikka- ja elintarviketutkimus, kotieläintuotannontutkimus, kasvintuotannon tutkimus, taloustutkimus, ympäristötutkimus ja teknologiatutkimus. MTT Laukaa kuuluu Kasvintuotannon tutkimukseen, jonka ydinsaamisalueita ovat kasvinviljelyteknologia, luomutuotanto, luonnon monimuotoisuus, kasvigeenivarat ja maisemanhoito sekä lisäksi kasvinsuojelu, maaperäasiat, kasvinravitseminen ja ympäristönkuormitus. (www.mtt.fi)

MTT Laukaan Kasvintuotannon tutkimuksessa tuotannossa olevien kasvien määrää karsittiin vuodeksi 2009. Aiemmin tarjolla olleista neljästä pensashanhikkilajikkeesta poistettiin kaksi lajiketta myynnistä. Myyntiin jäivät 'Goldteppich' ja 'Tervola', kun taas 'Elizabeth' ja 'Dart's Cream' poistettiin myynnistä. Poistettavia lajikkeita ei haluta hävittää kokonaan, koska lajikkeiden kysyntä saattaa muuttua. Pensashanhikkien ylläpitäminen laboratoriossa ja kenttäkokoelmina on kuitenkin työlästä ja aikaa vievää. Tämän takia kryosäilytysmenetelmän käyttöönotto tuli tarpeelliseksi. Ennen kuin menetelmä voidaan ottaa käyttöön, sen toimivuus pensashanhikeille täytyi tutkia, jotta ollaan varmoja kantojen säilymisestä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli testata pensashanhikeille sopiva kryosäilytysmenetelmä. Pyrkimyksenä oli kehittää menetelmä, jolla voitaisiin jatkossa säilyttää pensashanhikkeja pitkäaikaissäilytyksessä nestetypessä. MTT:llä pensashanhikkeja on aikaisemmin säilytetty *in vitro* -mikrolisäysviljelminä laboratoriossa ja taimina erilaisissa kenttäkokoelmissa kasvihuoneissa ja pelloilla.

Laukaassa kryosäilytysmenetelmänä käytetään muunneltua pisara-vitrifikaatiomenetelmää ja se on käytössä vadelmalla ja mansikalla. Pensashanhikki kuuluu samaan ruusukasvien alaheimoon kuin vadelma ja mansikka, joten oletuksena oli, että

sen pitkäaikaissäilyttäminen voisi myös onnistua samantyyppisellä kryosäilytysmenetelmällä. Pensashanhikille menetelmää ei kuitenkaan aiemmin ollut testattu. Menetelmä on vadelmalle ja mansikalle hieman erilainen. Pensashanhikille kokeiltiin ensisijaisesti menetelmää, joka mukaili aikaisempia menetelmiä ja pyrittiin tarvittaessa muuttamaan menetelmää pensashanhikille suotuisampaan suuntaan.

2 PENSASHANHIKKIEN LISÄYS JA KASVUSOLUKOT

2.1. Pensashanhikit

Pensashanhikki on nykyiseltä nimeltään *Dasiphora fruticosa* (L.) Rydb. (Räty & Alanko 2004, 55). Se tunnetaan kuitenkin paremmin entisellä nimellä *Potentilla fruticosa* (L.). Pensashanhikki kuuluu ruusukasvien heimoon *Rosaceae* ja alaheimoon *Rosoideae*. Ruusukasvien tärkeät alaheimot ovat alaheimo I, *Maloideae*, joka käsittää omenat (*Malus*-suku) sukulaisineen, ja alaheimo II, *Rosoideae*, johon kuuluvat muun muassa vadelmat ja vatukat (*Rubus*-suku), mansikat (*Fragaria*-suku), hanhikit (*Potentilla*-suku) ja ruusut (*Rosa*-suku). Ruusukasvien heimo *Rosaceae* käsittää siis ruusujen lisäksi myös eräitä muita kasviryhmii, joilla on samankaltaisuuksia ruusuihin. Edellä esitettyjen lisäksi ruusukasvien heimoon kuuluvat myös angervot, pihlajat ja luumut. (Alanko, Joy, Kahila & Tegel 1997, 50, 52.)

Pensashanhikkeja kasvaa luonnossakin kautta pohjoisen pallonpuoliskon. Niitä tavataan Pohjois-Amerikassa ja koko Pohjois-Aasiassa. Euroopassa pensashanhikkeja tavataan muutamilla erillisillä alueilla, joista lähimmät ovat Öölannissa, Gotlannissa ja Virossa. Pohjois-Amerikassa pensashanhikkia kasvaa metsärajan yläpuolella. Pensashanhikkilajikkeita on monenlaisia. Perinteisin kukanväri on keltainen, mutta sen rinnalla on nykyään monia valko-, vaaleanpuna- ja oranssinpunakukkaisia lajikkeita. Hanhikkien sukuun kuuluu noin 500 lajia, joista suurin osa on ruohovartisia. (Alanko 2003, 107.)

Opinnäytetyössä tutkittavina pensashanhikkilajikkeina käytettiin neljää eri lajiketta ('Goldteppich', 'Tervola', 'Elizabeth' ja 'Dart's Cream'). Lajikekuvaukset on saatu lähteestä Rätty & Taimistoviljelijät ry. (2005, 30–33) ja kuvat on ottanut Mikko Ruhanen Taimikko Ruhaselta. Suomen kasvien menestymisvyöhykekartta on liitteessä 1.

'Goldteppich' menestyy vyöhykkeillä I–V. Se on 60 cm korkea ja 100 cm leveä pensas, jota pidetään maanpeitehanhikeista parhaimpana. Alimmat oksat lamoavat rentoina maata vasten. Se erottuu muista pensashanhikeista, koska on väriltään muita tummemman vihreä. Kukat ovat isoja ja tummankeltaisia. Pensas alkaa kukkia jo kesäkesällä, ja kukkia avautuu jatkuvasti syyskuun loppuun saakka. 'Goldteppich' tuleeentuu ajoissa. (Ks. kuvio 1.A.)

'Tervola' menestyy vyöhykkeillä I–VI. Se on 150 cm korkea ja 120 cm leveä pensas. Lajike on löydetty Pohjois-Suomesta Tervolasta, mutta sen alkuperä on tuntematon. Se poikkeaa selvästi muista lajikkeista. Tervolanhanhikin lehdet ovat kiiltävän vihreät, pienet ja hieman karvaiset. Pensaasta saa erinomaisen aidanteen. Haarat kasvavat poikkeuksellisen pystyyn ja suurimmat pensaats ovat jopa 150 cm korkeita. Kukat ovat keskikokoisia ja sitruunankeltaisia. Tervolanhanhikin kukinta alkaa varhain. 'Tervola' tuleeentuu myös aikaisin. (Ks. kuvio 1.B.)

'Elizabeth' menestyy vyöhykkeillä I–IV (V). Se on 70 cm korkea ja 100 cm leveä maanpeitekasveihin luettava pensas. Pensas on rento-oksainen ja tiheä. Lehdet ovat väriltään harmahtavanvihreitä ja alta valkokarvaisia. Kukat ovat vaaleahkon keltaisia ja suuria. Pensas kukkii runsaasti vasta elo-syyskuun vaihteessa, mutta lämpiminä kesinä kukkia on runsaasti myös kesällä. Lajike tuleeentuu myöhään lokakuun lopussa. (Ks. kuvio 1.C.)

'Dart's Cream' menestyy vyöhykkeillä I–V. Se on 50 cm korkea ja 80 cm leveä maanpeitekasveihin luettava pensas. Pensas on leveä ja tiheä. Koko pensas näyttää väriltään vaalealta ja lehtiä ja versoja peittää vaaleanharmahtava karvoitus. Kukat ovat vaaleankeltaiset ja kauniin pastellinsävyiset. Kukkia alkaa avautua kesäkuussa ja kukinta jatkuu syyskuun loppuun. (Ks. kuvio 1.D.)



KUVIO 1. Pensashanhikit: 1.A 'Goldteppich', 1.B 'Tervola', 1.C 'Elizabeth', 1.D 'Dart's Cream' (Kuvat Mikko Ruhanen)

Muita Suomessa saatavilla olevia lajikkeita ovat esimerkiksi valkokukkaiset 'Abbotswood', 'Manchu', 'Veitchii', 'Mount Everest', 'Snowflake' ja 'Sandved'; vaaleankeltaiset 'Mänelys' ja 'Primrose Beauty'; tummankeltaiset 'Goldstar', 'Goldfinger', 'Hachmann's Gigant', 'Jackman' ja 'Klondike'; vaaleanpunaiset 'Princess', 'Lovely Pink' ja 'Pink Queen'; sekä oranssinkeltaiset tai punaiset 'Red ace' ja 'Tangerine'. (Alanko 2003, 108.)

2.2. Mikrolisäys ja kasvin kasvusolukot

Kasvin kasvun ymmärtämisen kannalta on tärkeää tietää, kuinka kasvaminen tapahtuu kasvissa, sillä mikrolisäys ja kasvusolukoiden muodostuminen voivat kuulostaa monimutkaisilta prosesseilta. Opinnäytetyössä käsiteltiin pensashanhikin *in vitro*-viljelmiä, jotka on lisätty mikrolisäyksellä laboratorio-olosuhteissa. Vitrifikaatiokäsittelyihin otettiin näistä mikrolisäysviljelmistä kärki- ja hankasilmuja.

Mikrolisäys on kasvin aseptista lisäämistä pienistä paloista. Emokasvista irrotettuja kappaleita viljellään kasvatusalustoilla, jotka sisältävät solukon elossa pitoon tarvittavia aineita. Hapen ja vedyn kasvi pystyy keräämään kasvatusastian sisällä olevasta ilmasta. (Haapala & Niskanen 1992, 10, 13.)

Kun viljely aloitetaan kasvin kasvullisesta eli vegetatiivisesta solukosta, pystytään tuottamaan emokasvin kanssa täysin samanlaisia kasveja, ja tämän vuoksi menetelmää voidaan nimittää kloonaukseksi. Viljelyn alkuvaihe on tärkein vaihe, mutta kun solukoviljelyn sopeutumisvaihe onnistuu, lisäysviljely on melko helppoa. (Haapala & Niskanen 1992, 15, 17.)

Kasvin kasvusolukot käyttävät kasvatusalustojen aineosia ravinteinaan. Pääasiallisesti kasvatusalustassa oleva sokeri toimii hiilen ja energian lähteenä, mutta se voi myös vaikuttaa alustan fysikaalisiin ominaisuuksiin. Sokeria tarvitaan, koska solukoviljelyssä kasvien yhteyttäminen on normaalioloihin verrattuna heikompaa tai se puuttuu täysin. Yleisin kasvatusalustassa käytettävä sokeri on sakkaroosi, joka hajoaa kasvu- alustojen steriloimiseksi tehtävän autoklavoinnin aikana glukoosiksi ja fruktoosiksi. Fysikaalisiin ominaisuuksiin sokeri vaikuttaa säätelemällä kasvin solukoiden osmoottista potentiaalia. Osmoottinen potentiaali kertoo nesteen ioniväkevyyden. Ioniväkevyydestä pystytään taas päättelemään veden kulkusuunta ja nopeus solukoon tai solukosta pois päin. (Haapala & Niskanen 1992, 39, 41.)

Kasvin kasvusolukkoa, joka ei vielä ole erikoistunut miksikään kasvinosaksi kutsutaan meristeemiksi. Meristeemisolukkoa on kaikkialla kasvavissa kasvinosissa. (Haapala & Niskanen 1992, 15.) Kasvusolukot eli meristeemit luovat kasvin kasvulle ja kasvun ylläpidolle perustan. Kasvusolukkojen solut ovat pieniä, suuritumaisia ja ohutseinäisiä, ja ne muistuttavatkin nuoria tylppysoluja. Soluissa on vain niukasti kalvorakenteita ja mitokondrioiden sisäkalvot ovat vielä heikosti kehittyneitä. Solun vakuolit ovat pieniä ja plastidit proplastideja, mutta kasvusolukoiden tärkein ominaisuus on niiden kyky jakaantua. Varren ja juuren kärkikasvusolukot säilyttävätkin jakautumiskykynsä koko kasvin elämän ajan. (Terävä 2008, 16.)

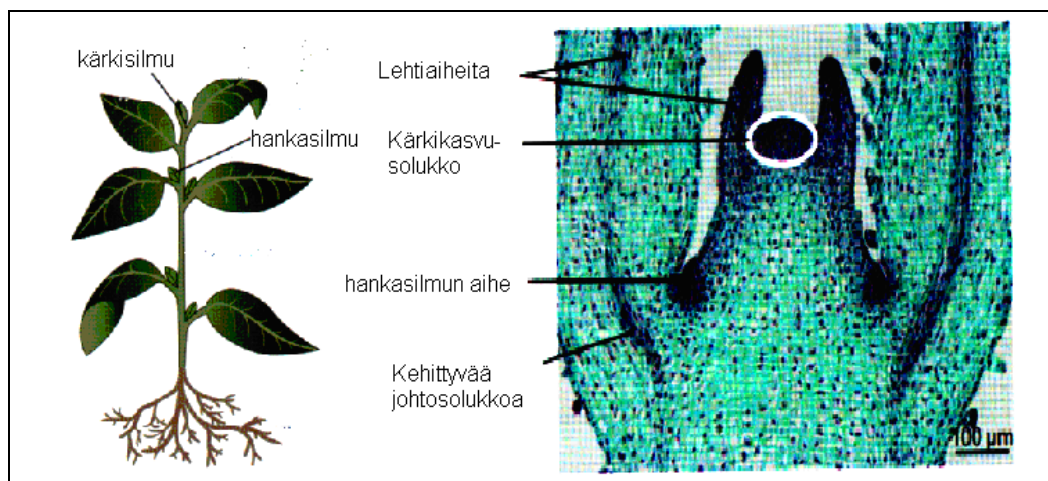
Kasvusolukoiden luokitteluun on erilaisia tapoja. Luokittelu voidaan tehdä sen perusteella, missä järjestyksessä solukot syntyvät tai minkälaisia johdannaissolukoita kasvusolukoista kehittyy. Yksi tapa on myös luokitella kasvusolukot niiden sijainnin perusteella kasvissa:

1. kärkikasvusolukot eli apikaalimeristeemit
2. sivukasvusolukot eli lateraaliset meristeemit
3. välikasvusolukot eli interkalaariset meristeemit
4. meristemoidit.

Meristemoidit ovat pieniä kasvin ilmaraon mallisia ja kolmion muotoisia meristeemien kantasoluja, jotka muodostuvat ennen meristeemejä. Kasvialkion varhaisessa kehitysvaiheessa kaikki sen solut ovat jakautumiskykyisiä eli meristemaattisia. Solujen jakautuessa alkioista tulee kaksinapainen, kun varren ja juuren kärkikasvusolukot alkavat erota toisistaan. Kärkikasvusolukosta muodostuvat kaikki verson ja juuren rakenteet. Kun kärkikasvusolukot jakautuvat ja erilaistuvat, tulokseksi saadaan varren ja juuren primaarinen kasvu eli pituuskasvu. Kasvin kärkikasvusolukon soluja nimitetäänkin alkeissoluiksi eli initiaalisoluiksi. Kun yksi alkeissolu jakaantuu, toisesta syntyneistä tytärsoluista tulee alkeissolu ja toisesta kehittyy johdannaissolu. Johdannaissoluista muodostuu johdannaiskasvusolukoita, jotka ovat yhä jakautumiskykyisiä, mutta niiden tehtävä on määräytynyt. (Terävä 2008, 38–39.)

Kärkikasvusolukoissa on tietty määrä alkeissoluja, vaikka kasvi samalla synnyttää uutta solukkoa, josta muodostuu uusia kasvinosia. Alkeissoluja on tyypillisesti kasvista riippuen 800–1200 ja kärkikasvusolukon halkaisija on keskimäärin 0,1 mm. Alkeissolujen määrä vaihtelee eri lajien kesken, esimerkiksi lituruoholla on 50–70 alkeissolua kärkikasvusolukossaan. (Terävä 2008, 78.)

Vitrifikaatiokäsittelyyn otetaan kasvin kärki- ja hankasilmuja. Kärki- ja hankasilmut osoitetaan kuviossa 2. Kärkisilmu on kasvin verson ylimmäinen silmu. Kärkisilmuja voi olla monta, mutta ne sijaitsevat kaikki varren tai sivuhaarojen päissä. Koska pensashanikki on todella haarautuva kasvi, siinä on useita kärkisilmuja haarautuneiden sivuhaarojen päissä. Hankasilmu on taas silmu, joka kasvaa kasvin sivuhaarojen kohdalla. Pensashanhikeilla kärkisilmut ovat yleensä isompia kuin hankasilmut.



KUVIO 2. Kasvin kärki- ja hankasilmät. Vasemmalla kärki- ja hankasilmien paikat kasvissa ja oikealla suurennettu mikroskooppikuva kasvin kasvusolukosta. (Terävä 2008, 16, 78.)

3 KYLMÄNKESTÄVYYS JA KRYOSÄILYTYS

3.1. Kylmänkestävyys ja kryokestävyys

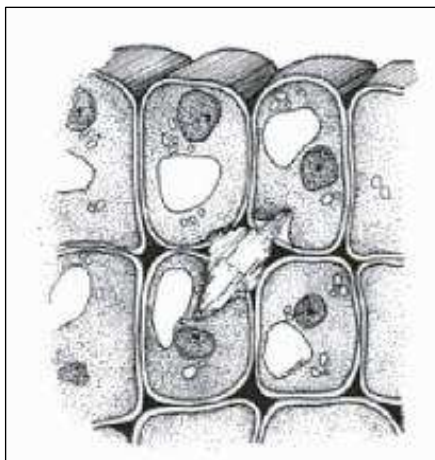
Kylmänkestävillä kasveilla on karaistumiskyky, jonka vuoksi niillä on teoriassa paremmat mahdollisuudet selvitä kylmäkäsittelystä verrattuna leudon seudun lajikkeisiin. Karaistumiskyvyn puutteen takia trooppisella alueella kasvavien kasvien kryosäilytys on vaikeampaa. Kasvin kylmänkestävyydestä pystytään joiltakin osin päättelemään, kuinka hyvin kasvi pystyy kestämaan kryokäsittelyjä. Kylmänkestävyys ja kryokestävyys ovat hyvin lähellä toisiaan, mutta kryokestävyyteen vaikuttavat kylmänkestävyyden lisäksi muutkin tekijät. Kryokestävyydellä tarkoitetaan tämän työn yhteydessä muun muassa sitä, kuinka hyvin kasvi kestää käsittelyt erilaisissa liuoksissa, esimerkiksi nestetyössä ja muissa kryosäilytyksessä käytettävissä vitrifikaatioliuoksissa. Kryokestävyyteen kuuluvat liuosten kestävyiden lisäksi sulatus ja muut kryokäsittelyn vaiheet ja kestävyiden mittana pidetään sitä, että kasvi pystyy kryokäsittelyn jälkeen lähtemään uudelleen kasvuun. Kryokestävyyttä voidaan mitata useilla tavoilla, mutta helpoin tapa on tehdä kryokokeita halutuilla muuttujilla ja seurata kasvin selviytymistä ja versomista.

Talvi ja kylmänkestävyys

Kasveilla on perinnöllisesti ohjautuva aikataulu, jonka mukaan kasvi varautuu talveen. Aikataulut vaihtelevat lajeittain sen mukaan mihin ilmastoon laji on sopeutunut. Pohjoisessa kasvavat kasvit lopettavat kasvunsa aikaisin syyskesällä. (Havas & Sulkava 1987, 43.) Saman kasvilajin eri alkuperää olevat yksilöt sietävät kylmää eri tavoin. Useammissa tapauksissa pohjoiset lajikkeet ovat kylmänkestävämpiä kuin eteläiset lajikkeet. (Salonen 2006, 84.) Talveen varautuminen on myös paljon ympäristön vaikutuksesta johtuvaa mukautumista ja perintötekijät määräävät, miten syvään ja hyvään talvilepoon kasvi pystyy käymään. Tämä ei kuitenkaan aina pidä paikkaansa, vaan samassa yksilöjoukossa eli populaatiossa esiintyy vaihtelua talveen varautumisessa ja talvensietokyvyssä. Kasvien väliset erot samalla alueella voivat olla yllättävän suuret. Yleensä vasta riittävän isoista yksilöjoukoista pystytään ilmentämään, että pohjoisessa kasvaneet populaatiot kestävät paremmin pohjoisia olosuhteita kuin eteläiset populaatiot. Kasvien kylmänkestävyyttä on vaikea mitata, koska samassakin kasvilajissa eri alkuperien välillä voi olla eroja ja kasvin ikä sekä ympäristötekijät muokkaavat kylmänsietokykyä. Myös eri kasvinosien kylmänkestävyydessä on eroja. (Havas & Sulkava 1987, 44, 88.)

Talveen varauduttaessa hyvin merkittävä tekijä on kasvin vesitalous. Jos jäätä pääsee muodostumaan solujen sisällä, se voi johtaa kasvin kuolemaan. Etenkin solulima eli sytoplasma on hyvin herkkä eikä kestä solun jäätymistä ja jääkiteiden syntymistä. Jos kasvin solussa on paljon vapaata vettä, solun sisältö jäätyy helposti. Tämän vuoksi solujen vesipitoisuutta on siis pystyttävä vähentämään talven ajaksi. Mitä vesipitoisempi kasvin solukko on, sitä kylmänarempi se myös on. Niinpä erittäin kylmänkestäviä ovat muun muassa siemenet ja silmut, joiden vesipitoisuus jää talvella alhaiseksi. Kun vettä poistetaan solujen sisältä, sisältö väkevöityy. Väkevöityminen auttaa solulimaa pysymään pakkasessa niin sanotussa alijäähtyneessä tilassa. Alijäähtyneessä tilassa soluun ei pääse muodostumaan jääkiteitä. Väkevöityneissä solunesteissä on paljon erilaisia liuenneita jäätymistä estäviä aineita, kuten sokereita. Jääkiteitä voi silti muodostua solun elävän sisällön ulkopuolelle, soluväleihin ja soluseiniin. Tyypillisesti ensijää muodostuu esimerkiksi silmujen tyviosaan, koska siellä oleva vesi on laimeampaa ja jäätyy sen vuoksi helpommin. Tämä on haitallista, koska jos jäätä syntyy paljon soluväleihin tai kuolleisiin solukoihin, voivat jääkiteet repiä solut irti toisistaan

ja rikkoa näin muita viereisiä solukoita. (Havas & Sulkava 1987, 48.) Kasvisolukoissa tapahtuva jäänmuodostuminen on esitetty kuviossa 3.



KUVIO 3. Jään muodostuminen elävässä kasvisolussa alkaa jääkiteiden kasvamisella soluväleissä. Veden siirtyessä ulos ympäröivistä soluista, soluväleissä kasvavat jääkiteet työntyvät helposti soluseinän rakenteiden läpi. Solukalvo sen sijaan säilyy vastustuskykyisenä jään tunkeutumiselle ja lähinnä vain joustaa sisäänpäin, säilyttäen näin elävän solun eheyden. (Marchand 1996, 48.)

Ulkoisessa jäänmuodostuksessa jäätä alkaa muodostua soluseinän ulkopinnalle (Tao & Li 1986, 306). Pohjoisempana kasvavien kasvien solut sietävät useasti solun ulkopuolista jäänmuodostusta. Ulkopuolinen jäätyminen on silti hyvin haitallista, vaikka solut sitä sietävätkin. (Salonen 2006, 84.) Solun ulkopuolelle muodostuva jää imee solun sisältä vettä vesihöyryn muodossa ja saa solun sisällön kuivumaan ja samalla väkevöitymään. Kuivunut solulima kutistuu jopa 2/3:aan alkuperäisestä koostaan. Myös elävät solukalvot puristuvat kasaan ja poimuuntuvat. Samoin tekevät myös soluseinät. Pakkanen merkitsee siis solujen kohdalla kuivuutta. Kutistuneesta tilasta on keväällä pystyttävä palautumaan takaisin normaaliin tilaan. Jos palautuminen ei onnistu, se merkitsee solulle kuolemaa. Solulima ei aina kestä tällaista rankkaa kuivumista eikä myöskään liian nopeaa sulamista. Lisäksi kuivumisesta on muuta vaaraa solulle. Solun sisällön väkevöityessä voivat eräiden aineiden (esimerkiksi suolat ja orgaaniset hapot) pitoisuudet nousta liian korkeiksi ja johtaa solun myrkyttymiseen. Kun vesi vähenee soluista, niiden entsyymiaktiivisuuskin vähenee eivätkä solut kykene torjumaan myrkkyyvaikutusta. (Havas & Sulkava 1987, 49, 57–58.)

Joillakin kasveilla alkaa jo syksyn alussa kertyä soluihin glyseroleja. Glyseroli toimii soluissa jäänestoaineena. (Salonen 2006, 82.) Muita luonnossa toimivia jäänestoaineita eli kryoprotektantteja ovat antosyaanit, sokerit, vesiliukoiset aminohapot ja valkuaisaineet. Lisäksi sokerit toimivat myös energianlähteinä, kun kasvit muodostavat muita suoja-aineita talven varalle. Yksittäisistä sokerilaaduista ainakin raffinoosin, sakkaroosin, glukoosin ja fruktoosin on todettu lisäävän kylmänkestävyyttä kasveissa. Sokerit kerääntyvät kasvin silmuihin ja versoihin. Kasvinosien välillä on suuria eroja kylmänsietokyvyssä. Monilla kasveilla kärki- ja kukkasilmut ovat arkoja kylmälle ja alempana varressa olevat silmut, niin kutsutut leposilmut, ovat hyvin kylmänkestäviä kärkisilmuihin verrattuina. (Havas & Sulkava 1987, 59, 89.)

Kasvien tai kasvinosien yleisimmät talvikuolemiin johtavat syyt ovat paleltuminen tai talvikuivuminen (Salonen 2006, 84). Altistettaessa kasvi nopeasti kovalle pakkaselle se kuolee ennemmin kylmyyteen kuin kuivuuteen, sillä se ei kerkeä varautua yhtäkkiseen kylmyyteen. Myös kasvin sisältämän veden määrällä on merkitystä kasvin talvehtimiseen. Kylmyydestä tai kuivuudesta aiheutuvat vauriot voivat myöhemmin leviätä muualle kasviin. Kuolleet solukot näet muodostavat myrkyllisiä aineita, jotka voivat levitä tuhoutuneesta kohdasta muuallekin kasviin vesivirtojen myötä. Myös vahingolliset bakteerit voivat saada vallan kasvista. (Havas & Sulkava 1987, 92, 151.)

Kryokokeet ja kryokestävyys

Kryosäilytysmenetelmät ovat kehittyneet huomattavasti viime vuosikymmeninä, ja nykyään ne ovat luotettava vaihtoehtoinen menetelmä pitkäaikaissäilytykseen. Kirjava joukko erilaisia genotyyppejä voidaan kryosäilyttää, mutta suurille kokoelmille voidaan joutua käyttämään useita eri tekniikoita, koska eri genotyypit reagoivat kryosäilytykseen niin eri tavoin. Optimituloksiin päästään, kun järjestetään hyvät kasvuolosuhteet esikasvatuksissa ja menetelmän jälkeisessä elvytyskasvatuksessa ja suoritetaan menetelmä oikealla tavalla. (Uchendu & Reed 2008, 181–182.)

Kasvin eloonjäämiseen kryokokeiden jälkeen vaikuttaa moni asia. Yksi niistä on kasvin fysiologinen tila, joka käsittää kasvin iän, viljelmän kunnon ja myös käytettävän viljelmän tyypin. Toinen merkittävä asia on, minkälainen on käytettävä jäänestoaine ja mikä on sen pitoisuus. Kasvin eloonjäämiseen vaikuttavat myös pakastusmenetelmä,

säilytyslämpötila, sekä pakastettujen näytteiden sulatusmenetelmä. Lisäksi eloonjäämistä voidaan määrittää eri menetelmin. Menetelmien eroavaisuudet aiheuttavat vaihtelua eloonjäämistuloksiin. (Bajaj 1995, 14.)

Säännöllisesti lisätty solukko ja erityisesti sen eksponentiaalinen kasvuvaihe aikaansaa erittäin sytoplasmisia, ohutseinäisiä, vähemmän vakuoleja sisältäviä, pieniä soluja ja solukeräytymät kestävät paremmin kylmää kuin solut, jotka ovat isoja, paksuseinäisiä ja joilla on enemmän vakuoleja. Lisäksi pienet ja kehittymättömät tsygoottiset ja somaattiset alkiot tai siitepöly kestävät paremmin kryokokeissa kuin täysin erilaistuneet alkiot. Tämän vuoksi pallomaiset ja sydämenmuotoiset alkiot antavat korkeamman eloonjäämisasteen. (Bajaj 1995, 14.)

Viljelmien kyky selvitä nestemäisestä tyypestä riippuu siis paljon mikrolisätyn aineiston fysiologisesta tilasta ja esikäsittelyvaiheista. Esimerkkinä tästä voidaan pitää sitä, että neilikalla tehtyjen kokeiden perusteella paras saavutettu tulos vastasi lähes sataprosenttista säilyvyyttä. Tämä saavutettiin kärkisilmuilla, kun taas hankasilmujen kylmänsietokyky laski sitä mukaa, mitä kauempana kärkisilmusta hankasilmu sijaitsi. Silmujen välinen eroavaisuus kylmänsietokykyä verrattaessa saa selityksensä niiden erilaisesta fysiologisesta tilasta. (Dereuddre, Fabre & Bassaglia 1988, 170, 173.) Jotta voitaisiin varmistaa mahdollisimman hyvä selviytyminen, viljelmiä tulisi käyttää ainoastaan, kun ne ovat optimaalisessa morfologisessa ja fysiologisessa tilassa (Dumet, Engelmann, Chabrillange, Richaud, Durand-Gasselin & Duval 1993, 278).

Kasvusolukoiden täytyy myös olla suhteellisen kuivia, ennen kuin ne voidaan kryosäilyttää nestetyppeen. Nestemäisessä liuoksessa on olemassa kahdenlaista siirtymää nestemäisestä faasista kiinteään faasiin. Jäänmuodostuminen on olomuodon muutos nesteestä kiinteään jääkiteeseen ja vitrifikaatio on olomuodon muutos nesteestä amorfiseksi, lasimaiseksi, kiinteäksi yhdisteeksi, joka estää jääkiteiden muodostumisen. Vesi on sellainen kemiallinen yhdiste, joka on vaikea saada vitrifioitumaan, koska jääkiteiden kasvun määrä on todella korkea jopa juuri alle jäätymispisteen. Kuitenkin on olemassa erittäin konsentroituja kryoprotektanttisia liuoksia, kuten glyseroli, joka on erittäin viskoosia ja alijäähtyy helposti alle -70 celsiusasteessa. Glyserolilla saadaan vitrifikaatio mahdolliseksi nopeassa jäähdytyksessä. (Reed 2008, 34.)

Lopputulokset, joita saadaan eri pakastusmenetelmillä, ovat melko vaihtelevia. Solujen eloonjäämistä on pystytty osoittamaan viljelmille pakastuksella, jossa käytetään esijäädystä ja solujen jäädystä hitaasti ja säädellysti. Pakastusmenetelmistä nopein ja yksinkertaisin on kuitenkin vitrifikaatio, jossa solut pystytään jäädystämään nopeasti, minkä vuoksi menetelmää suositaan nykyään. Viljelmien, jotka säilytetään -20°C :ssa tai -70°C / -80°C :ssa on havaittu huonontuvan tietyn ajan kuluessa. Tämän vuoksi pitkäaikaissäilytykseen menevää geenivara-aineistoa täytyisi säilyttää nestemäisessä työssä. (Bajaj 1995, 14–15.) Kontaminaatioiden välttämiseksi olisi varmin- ta säilyttää materiaalia nestemäisen tyn sijaan sen kaasufaasissa alle -150°C :ssa.

Useat aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että erilaisilla kryosäilytysmenetelmillä saavutettu kasvien eloonjääminen ja kasvuunlähtö ovat genotyypistä riippuvaisia (Kryszcuk, Joachim, Grube, & Zimnoch-Guzowska 2006, 198). Tämä tarkoittaa sitä, että saman lajin eri lajikkeilla saadaan vaihtelevia tuloksia.

Tavallinen vitrifikaatio-menetelmä toimii nuorille silmuille, joilla on juuri voimakas kasvuvaihe, kun taas pisara-menetelmä tehoaa suhteellisen vanhoihin silmuihin, joiden voimakas kasvuvaihe on jo ohitse. Silmut ovat vakiinnuttaneet kasvunsa ja kykenevät näin ollen paremmin reagoimaan kylmyysstressiin. (Kryszcuk ym. 2006, 199.) Vitrifikaatio-menetelmässä solukot saadaan suhteellisen kuiviksi vitrifikaatioliuoksilla, minkä jälkeen pystytään käyttämään suoraa upotusta nestetyppeen ilman solujen vaurioitumista. Yleensä käytetään glyserolipohjaista liuosta, jota nimitetään PVS2-liuokseksi. Liuoksen ovat kehittäneet Sakai, Kobayashi & Oiyama vuonna 1990. (Reed 2008, 35.) Joillakin kasveilla, esimerkiksi valkosipulilla, on osoitettu saatavan parempia tuloksia käyttämällä liuoksena PVS3-liuosta (Kim, Cho & Park 2006, 129). Yleisin käytetyistä jäänestoaineista on dimetyylisulfoksidi (DMSO), joka on solukalvon läpäisevää ja jota voidaan käyttää yhdistettynä ei-läpäiseviin osmoottisesti aktiivisiin lisäaineisiin, kuten sokereihin tai polyetyleeniglykoliin (Reed 2008, 20).

Jään vähentäminen on tärkeää solujen selviytymiselle kryosäilytyksen vaiheissa, koska jää aiheuttaa kuivumista. Kuivuminen taas altistaa soluseinät mekaaniselle stressille. (Tao & Li 1986, 305.) Kryosuojauksessa on kaksi merkittävää piirrettä. Ensimmäinen on se, että käytettävän jäänestoaineen täytyisi pystyä läpäisemään solu tai muuten se aiheuttaa osmoottisesta paineesta johtuvaa kuivumista ja vauriota, vaikka sen täy-

tyisi päinvastoin suojella solua. Toinen tärkeä ominaisuus on, että käytettävä kryoprotektantti olisi kasveille myrkytöntä käytettävissä konsentraatioissa, joissa se on tehokasta. Kun käytettävä jäänestoaaine pystyy läpäisemään solun ja on haitatonta solulle puhutaan, että se toimii kolligatiivisesti. (Reed 2008, 25.) Kasveille käytetyt jäänestoaaineet jaotellaan sen mukaan kuinka ne pystyvät läpäisemään kasvisolut. Taulukossa 1 kerrotaan jäänestoaaineiden läpäisevyydestä: minkälaiset jäänestoaaineet toimivat vastaavalla tavalla ja kuinka ne vaikuttavat kryosäilytykseen.

TAULUKKO 1. Jäänestoaaineiden luokittelu (Reed 2008, 27)

LÄPÄISEVYYS	JÄÄNESTOAINEET	VAIKUTUS KRYOSÄILYTYKSESSÄ
(1) Ei pysty läpäisemään soluseinää.	Polymeerit joilla suuret molekyyli-massat esimerkiksi PEG ₆₀₀₀ , PVP, polysakkaridit ja proteiinit	Tulevat konsentroituneiksi ennen jääkittämistä, toimivat inhibiitteina jään kasvulle ja suojelevat mekaanista tuhoa vastaan.
(2) Pystyy läpäisemään ainoastaan soluseinän.	Oligosakkaridit, mannitoli, aminohapot (proliini) ja polymeerit joilla on pienemmät molekyyli-massat PEG ₁₀₀₀ .	Estävät jääkittämistä vahingoittamasta solun membraania ja ovat puskureina sytoplasman liialliselle kuivumiselle.
(3) Pystyy läpäisemään sekä soluseinän että membraanin	DMSO ja glyseroli	Toimivat kolligatiivisesti, mutta voivat myös tuottaa väliaikaista plasmolyyysiä ja vähentävät adheesiota soluseinän ja membraanin välillä.

Alemman molekyyli-massan omaava polyetyleeniglykoli (PEG₁₀₀₀) voi tunkeutua soluseinään ja aiheuttaa plasmolyyysiä, kun taas PEG₆₀₀₀ on liian suuri tunkeutuakseen soluseinään (Tao & Li 1986, 307).

Suora altistaminen vitrifikaatioliuoksille ei ole hyväksi vähemmän kestäville soluille ja meristeemeille, koska vitrifikaatioliuos aiheuttaa haitallisia vaikutuksia kasville. Haittavaikutuksista yleisimmät ovat osmoottinen stressi ja kemiallinen myrkyttyminen. Kuivumisesta aiheutuvia haitallisia vaikutuksia voidaan vähentää erilaisilla esikäsittelyillä, kuten kylmäkäsittelyllä ja esikasvatuksella korkean pitoisuuden omaavilla sakkaroosi- tai sorbitolialustoilla sekä lisäksi kryosuojausmenetelmillä, esimerkiksi latausmenetelmällä. Latauskäsittelyn on osoitettu olevan todella tehokas menetelmä edistämään kuivumisensietokykyä soluissa ja meristeemeissä. (Matsumoto, Sakai & Yamada 1995, 240.) Kun kasveja altistetaan kryosäilytysliuoksille, myös liian suuret viivästyksiset käsittelyajoissa saattavat aiheuttaa vaurioita kasvusolukkoon. Vauriot aiheuttavat selviytyneisiin soluihin liikaa stressiä, mikä voi johtaa elossa olevien solu-

jen kuolemiseen. Solujen eloonjäämistä pidetään päätavoitteena kryosäilytyksessä, joten solujen kuoleminen on todella epätoivottavaa. (Bajaj 1995, 15.)

Kun käytetään nopeaa jäädytystä, muodostuvat jääkiteet solukoissa ovat pieniä ja harmittomia solukoille. Kun sulatus suoritetaan yhtälailla nopeasti, pienet jääkiteet ehtivät sulaa ennen kuin ne ehtivät kasvaa ja suurin osa soluista säilyy elinkelpoisina. Jos sulatus suoritettaisiin hitaasti, jääkiteet alkaisivat kasvaa ja näin ollen tappaisivat solut. (Sakai & Yoshida 1967, 1700.)

Keskeisimpänä tekijänä arvioitaessa kryosäilytysmenetelmää on silmujen kasvuunlähtö, koska ainoastaan kokeita, joista saadaan kasvuunlähteneitä viljelmiä, voidaan sanoa onnistuneiksi (Kryszczuk ym. 2006, 198). On aina joitain soluja, jotka ovat osittain vaurioituneet tai jotka ovat tietynlaisessa kylmähokissa eivätkä tämän vuoksi lähde kasvamaan (Bajaj 1995, 16). On erityisen tärkeää, että kryosäilytetyt silmut pystyvät kehittymään täysin samanlaisiksi kasveiksi kuin käsittelemättömistä silmuista kehittyvät yksilöt ovat eikä niistä havaita morfologisia muutoksia. Myöhemmässä vaiheessa niiden fenotyyppi täytyy varmistaa sytologisin, biokemiallisin ja morfologisin analyysin. (Matsumoto, Sakai & Yamada 1994, 445–446.)

3.2. Kryosäilytysmenetelmät

Kryosäilytysmenetelmiä ja erilaisia tekniikoita on kehitelty, jotta voitaisiin säilyttää erilaista kasvimateriaalia. Säilytettävät kasviaineistot voivat olla siemeniä, siitepölyä, verson kärkisilmuja, lepotilaisia silmuja, vielä kehittymättömiä alkioita, tsygoottisia ja somaattisia alkioita sekä kallusta tai mikroviljelmiä. Säilytysmenetelmä valitaan sen perusteella mitä halutaan säilöä ja mikä menetelmä toimii millekin aineistolle. Esimerkiksi lepotilaisille silmuille käytetty kryosäilytysmenetelmä soveltuu parhaiten kylmäkaraistuille puuvartisille kasveille. Kun taas *in vitro* -mikroviljelmistä kasvatettuja silmuja voidaan säilöä sekä trooppisen että lauhkean vyöhykkeen kasveista. (Reed 2008, 7.)

Yleisimmät kryosäilytysmenetelmät jakaantuvat hitaan pakastuksen menetelmiin ja nopean pakastuksen menetelmiin. Hitaan pakastuksen menetelmistä puhutaan, kun pakastaminen tapahtuu hitaasti ja säädellysti jolloin käytetään tarkoitukseen soveltuvia pakastimia. Nopean pakastuksen menetelmissä pakastaminen tapahtuu suoraan nestemäiseen tyypeen upottamalla. Molemmista tavoista on kehitelty erilaisia menetelmiä ja variaatioita, jotta voitaisiin säilyttää mahdollisimman monia kasveja. Yleisimmät menetelmät ovat kontrolloitu asteittainen jäähdytys, vitrifikaatio ja dehydraatio. Mutta on olemassa myös muita yhdisteltyjä menetelmiä kuten kapselointi-dehydraatio, kapselointi-vitrifikaatio ja lepotilaisille silmuille kehitelty menetelmä.

Kontrolloitu asteittainen jäähdytys oli ensimmäinen tekniikka, joka kehiteltiin kasvien säilyttämiseen. Suurin etu tässä tekniikassa muihin tekniikoihin verrattaessa on, että voidaan käsitellä suuria aineistoja yhdellä käsittelyllä eikä tarvita yhtä paljon aikaa yksittäisen näytteen käsittelyyn. Kontrolloidussa asteittaisessa jäähdytyksessä käytetään jäähdytystä, jossa jäähdytetään 0,1–1 celsiusastetta minuutissa noin -40 celsiusasteeseen asti, jonka jälkeen näyte upotetaan nestemäiseen tyypeen. (Reed 2008 10, 85, 87.)

Kontrolloidulla asteittaisella jäähdytyksellä ei kuitenkaan aina saavutettu hyviä tuloksia ja etenkin trooppisilla kasveilla saatiin heikkoja tuloksia. Tämän vuoksi aloitettiin uusien menetelmien tutkiminen sekä kehittäminen ja 1990-luvulla keksittiin vitrifikaatioon perustuvat menetelmät. Samalla vuosikymmenellä kehiteltiin myös kapselointi-dehydraatio menetelmä, jossa eristetty kasviaineisto pakataan kalsium-alginaattikapseleihin. Kapselointi-dehydraatiotekniikka on onnistunut ainakin seitsemälläkymmenellä eri kasvilajilla. (Reed 2008 59–60.)

Vitrifikaatio-menetelmät jakaantuvat alkuperäiseen vitrifikaatio-menetelmään, pisaravitrifikaatio-menetelmään ja kapselointi-vitrifikaatioon. Menetelmät eroavat toisistaan vain suoritusvaiheittensa kannalta, mutta kaikissa kasvinäytteet käsitellään kuitenkin vitrifikaatioliuoksilla, jonka vuoksi puhutaan vitrifikaatio-menetelmistä. Tavallisella vitrifikaatio-menetelmällä on tutkittu useita erilaisia kasveja. Pisara-vitrifikaatio-menetelmä on sitä vastoin melko uusi menetelmä ja sillä ei ole vielä tutkittu yhtä suurta määrää erilaisia kasveja.

Pisara-vitrifikaatiomenetelmä on kehitelty alun alkaen perunan kryosäilytysmenetelmäksi, mutta nykyään se on käytössä jo monella muullakin kasvilla, kuten parsalla, krysanteemilla ja jamssilla. Muunneltua pisara-vitrifikaatio-menetelmää on onnistuneesti käytetty *Prunus*-lajeilla, papaijalla ja banaanilla, sekä muutamilla ruusuilla. (Halmagyi & Pinker 2006, 145–146.) Pisara-vitrifikaatiomenetelmä on onnistunut myös mintulla (Uchendu & Reed 2008, 186) ja tarolla (Santh, Panis, Taylor & Tyagi 2008, 110). Taulukossa 2 esitetään yleisimpien kryosäilytysmenetelmien edut ja haitat.

TAULUKKO 2. Yleisimpien kryosäilytysmenetelmien edut ja haitat (Reed 2008, 10). Perinteiset kryosäilytysmenetelmät on merkitty violetilla pohjalla ja nykyaikaisemmat kryosäilytysmenetelmät taas vihreällä pohjalla.

KRYOSÄILYTYSMENETELMÄ	EDUT	HAITAT
Kontrolloitu asteittainen jäädytys	On stabiili murtumiselle, suhteellisen myrkyttömät jäänestoaineet, vie vähän suoritus aikaa.	Vaatii kalliin laitteiston, alhainen soveltuvuus trooppisille kasvilajeille.
Vitrifikaatio	Ei tarvita kallista laitteistoa, nopea menetelmä, nopea kasvien elpyminen	Vitrifikaatioliuokset ovat myrkyllisiä useille kasveille, solukkojen murtuminen mahdollista, vaatii tarkat ajoitukset liuoskäsittelyissä.
Kapselointi-dehydraatio	Ei tarvita kallista laitteistoa, ei myrkyllisiä jäänestoaineita, yksinkertainen sulatusvaihe, nopea kasvien elpyminen.	Vaatii jokaisen kapselin käsittelyä useita kertoja, jotkin kasvit eivät kestä korkeita sokerikonsentraatioita.
Lepotilaisten silmujen säilyttäminen	On helppo suorittaa, käyttökelpoinen useille lauhkean vyöhykkeen puulajeille.	Vaatii kalliin laitteiston, sekä suuren varastointitilan, elvytys vaatii varttamisen tai silmuttamisen. Toimii parhaiten lauhkean vyöhykkeen kasveilla.

Solukkoviljelmille eli niin sanotuille *in vitro* -kasviaineistoille näistä menetelmistä soveltuvat parhaiten vitrifikaatiomenetelmät ja dehydraatiomenetelmät, kun taas kontrolloitu asteittainen jäädytys soveltuu paremmin myös luonnossa esiintyville viljelmille eli *in vivo* -kasviaineistoille. Menetelmän valintaan vaikuttaa säilytettävän kasviaineiston lisäksi myös käytettävät laitteistot, henkilöstön asiantuntemus, kasvilaji ja millä tavoin kasviaineisto halutaan säilöä (Reed 2008, 10).

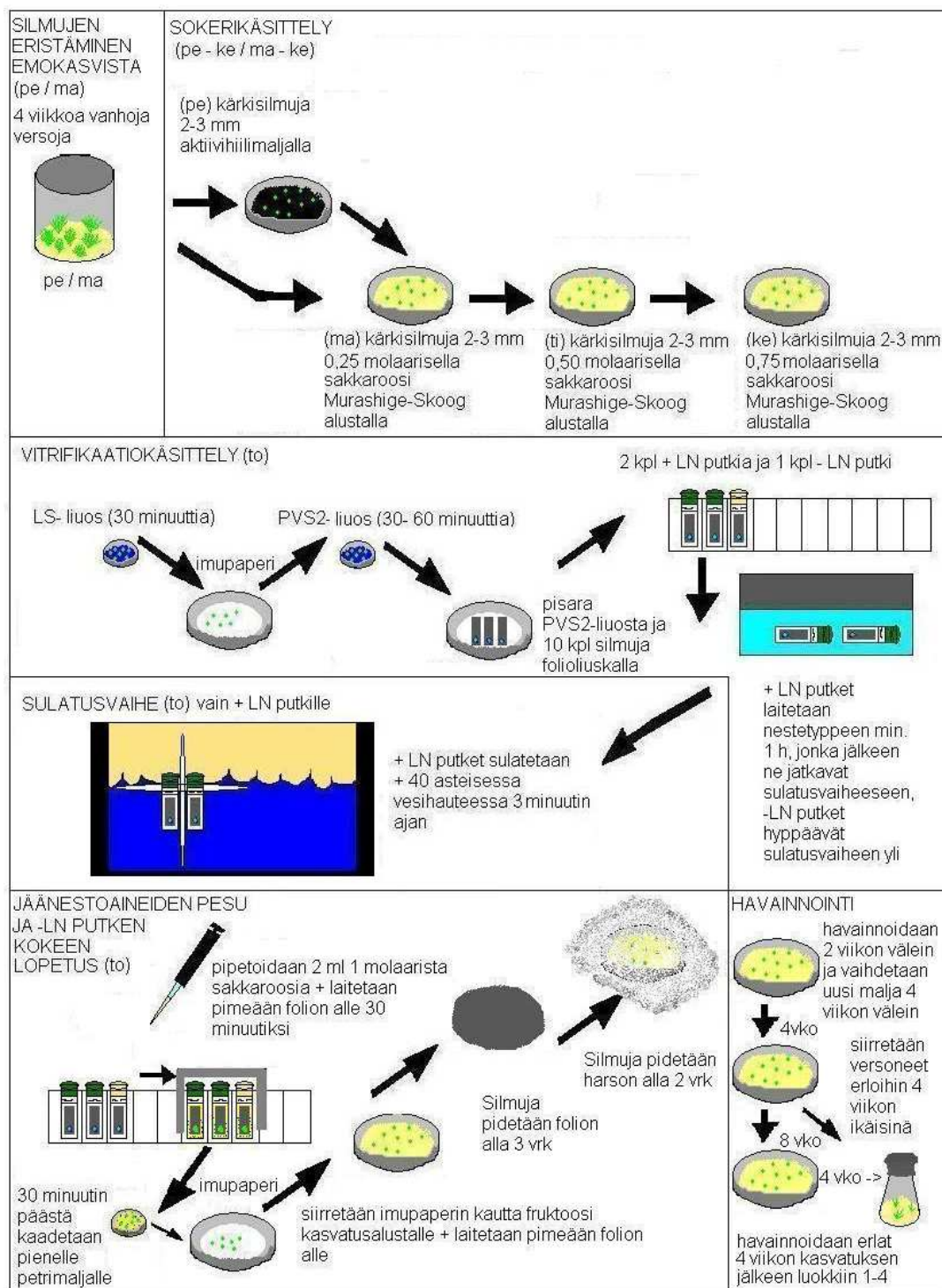
4 TUTKIMUSAINEISTO JA -MENETELMÄT

4.1. Pisara-vitrifikaatio-menetelmä

MTT:n Kasvintuotannon tutkimus -yksikössä Laukaassa kryosäilytystä tehdään muunnellulla pisara-vitrifikaatio-menetelmällä ja menetelmä on käytössä vadelmalla ja mansikalla. (Nukari, Uosukainen, Rokka, Antonius, Wang & Valkonen 2009, 122.) Kryosäilytysmenetelmiä kokeillaan kaiken aikaa myös muilla kasveilla ja tutkimusta on tehty esimerkiksi herukoilla, *Prunus*-lajeilla ja perunoilla. (Nukari, Rantala & Uosukainen 2008, 3.) Pensashanhikeille ei ole aikaisemmin tehty pisara-vitrifikaatio-menetelmän testausta eikä kryosäilytyskokeita ja nestetyppeen säilyttäminen on täysin uusi säilytysmenetelmä pensashanhikeille. Tulokset ovat hyvin tärkeitä, koska niiden perusteella saadaan selvemmäksi kokonais kuvaa kryosäilytyksestä ja pystytään ymmärtämään paremmin mahdollisuuksia muiden lajien pitkäaikaissäilytykseen nestetyppeen. Opinnäytetyön kokeissa käytettiin muokattua pisara-vitrifikaatio-menetelmää (kuvio 4).

4.2. Tutkimuksen lähtökohdat

Koska pensashanhikkikokeita ei aikaisemmin ole suoritettu, täytyi aluksi eristää erikokoisia ja erityyppisiä silmuja parhaiten soveltuvan silmutyyppin määrittämiseksi. Tämän vuoksi yhdeksässä ensimmäisessä koesarjassa otettiin sekä hanka- että kärkisilmuja. Kokoluokiksi päätettiin valita kolme kokoluokkaa, joista selviämistä tarkailtiin. Kokoluokat olivat 0,5–1 millimetriä, 1–2 millimetriä ja 2–3 millimetriä.



KUVIO 4. Pisara-vitrifikaatio-menetelmän suoritus MTT Laukaassa.

Aluksi kaikilla lajikkeilla tehtiin vitrifikaatiokäsittely, niin että PVS2-aikana oli 45 minuuttia. Tämän jälkeen ruvettiin muuttamaan aikaa. Kokeiltiin sekä lyhyempiä että pitempiä aikoja. Lyhyin aika oli 30 minuuttia ja pisin 60 minuuttia. Vitrifikaatiokäsittelyssä ainut muuttuja oli PVS2-käsittelyaika. LS-käsittelyaika pidettiin vakiona, ja se oli kaikissa kokeissa 30 minuuttia. Kun ruvettiin muokkaamaan menetelmää, muuttuvat tekijät pääteltiin aikaisemmista kokeista selviytyneiden ja versovien silmujen mukaan. PVS2-aikaa pyrittiin muuttamaan siihen suuntaan, missä silmut elpyvät ja ennen kaikkea versovat parhaiten. Viimeisissä kokeissa pyrittiin selvittämään sokereiden ja aktiivihiiilen vaikutusta kokeisiin. Sokereiden vaikutuksesta on tieteellistä näyttöä ja niiden on todettu parantavan nestetypistä elpyneiden silmujen määrää. Viimeisissä kokeissa käytettiin huonommin kasvuunlähtevää lajiketta selvittämään sokerien ja aktiivihiiilen vaikutusta kokeen onnistumiseen. Jos olisi käytetty hyvin kasvuunlähtevää lajiketta, eroa ei olisi huomannut niin selvästi tai ollenkaan.

4.3. Koesarjat

Koesarjoja oli kaiken kaikkiaan 20 kappaletta, ja ne jakaantuivat lajikkeittain seuraavasti: 'Goldteppich' neljä koesarjaa (G1–G4), 'Tervola' neljä koesarjaa (T1–T4), 'Elizabeth' kuusi koesarjaa (E1–E6) ja 'Dart's Cream' kuusi koesarjaa (D1–D6). Tarkemmat tiedot jatkossa koodein merkityistä koesarjoista ilmenevät liitteestä 2. Kaikkia koesarjoja ei pystytty suorittamaan täysin identtisesti, koska silmujen ottamiseen ja vitrifikaatiokäsittelyjen suorittamiseen ei ollut aina saman verran aikaa käytettävänä. Rajallinen aika johti siihen, että koesarjoihin jouduttiin ottamaan vaihtelevia määriä silmuja. Heikoimmin kasvuun lähtevillä lajikkeilla tehtiin enemmän kokeita verrattuna paremmin lähteviin lajikkeisiin. Silmuille pyrittiin tekemään aina sekä nestetyppeen menevä koe +LN että kontrollikoe -LN. Aineistosta riippuen tehtiin +LN-käsittelylle mahdollisuuksien mukaan myös rinnakkainen näyte. Tämä tarkoittaa, että jos aineistossa oli silmuja 30 kappaletta, tehtiin kaksi nestetyppeen menevää koetta ja yksi kontrolli. Jos silmuja oli vain 20 kappaletta, ei tehty rinnakkaista näytettä vaan silmut jaettiin yhteen nestetyppeen menevään kokeeseen ja yhteen kontrolliin. Jos silmuja oli vain 10 kappaletta, ei tehty kontrollia ja tehtiin vain nestetyppeen menevä putki.

5 TYÖN TOTEUTUSVAIHEET

5.1. Alkuvalmistelut

Aluksi tehtiin aikataulutusta valmiiksi. Aikataulutukseen pyrittiin selvittämään tarvittavat mikrolisäykset, sekä silmujen eristämiset, pakastukset ja sulatukset sekä arvioitiin, milloin saataisiin tuloksia kasvaneista pensashanhikeista. Neljän viikon kuluttua kunkin lajikkeen mikrolisäämisestä kasvista otettiin silmuja, joko maanantaina tai perjantaina. Silmujen eristämisen jälkeen pakastukset ja sulatukset tehtiin tulevana torstaina.

5.2. Esikasvatus

Silmut otettiin aina 4-viikkoisista viljelmistä, koska sen ikäisten viljelmien on todettu olevan hyvässä kasvun vaiheessa kryokokeita ajatellen. Niinpä aina neljä viikkoa ennen silmujen ottamista tehtiin mikrolisäys lajikkeesta, jota haluttiin pakastaa. Mikrolisäys tehtiin isoon lasipurkkiin, jossa oli muovinen kansi. Pensashanhikki kasvaa selkeämmin kuin foliokantisessa lasipurkissa. Jokaiseen purkkiin laitettiin aina seitsemän kappaletta versoja. Purkkeja ei tarvinnut lisätä kovin monta, koska jo parista purkista saatiin riittävästi silmuja. Yhdestä versosta kasvaneesta tuppaa saatiin keskimäärin kuusi kärkisilmua, joten purkista saatiin näin ollen noin 42 kappaletta kärkisilmuja. Purkkeja täytyi kuitenkin olla aina riittävästi kontaminaatioiden varalle, jotta voitiin olla varmoja, ettei kanta häviä. Lisäksi purkkeja täytyi olla myös sen varten, että voitiin tehdä uusia lisäysjakoja. Esikasvatusalusta oli kolmella lajikkeella ('Tervola', 'Dart's Cream' ja 'Elizabeth') fruktoosipohjainen ja yhdellä lajikkeella ('Goldteppich') sakkaroosipohjainen. 'Goldteppich'-lajike ei kasva hyvin fruktoosipohjaisella esikasvatusalustalla, minkä vuoksi sillä käytettiin poikkeavaa alustaa.

5.3. Silmujen eristäminen emokasvista

Eri kasvilajeilla hankasilmujen ja kärkisilmujen selviytyminen ja versominen vaihtelevat merkittävästi. Koska ennen kokeita ei tiedetty, kumpi silmutyyppi selviäisi ja versoisi paremmin, täytyi aluksi eristää molempia ja tehdä kokeita asian selvittämiseksi. Silmut eristettiin emokasvista 4-viikkoisista viljelmistä. Yleisimmin käytetyt silmujen eristämispäivät olivat maanantai ja perjantai, koska silmujen jatkokäsittelyt oli näin helpompi suorittaa työviikon puitteissa. Kun pakastus- ja sulatuskäsittelyt tehtiin torstaina, tuli kokeen lopettamisen jälkeiseksi folion poistamisen ajankohdiksi maanantai ja harso poistettiin taas keskiviikkona. Käytännöllisyyden ja toistettavuuden vuoksi kokeita tehtiin siis kaiken aikaa sekä maanantaina että perjantaina eikä ruvettu ottamaan silmuja enää kolmantena päivänä. Tämähän olisi ollut yksi muuttujaa lisää. Vadelmalle kehitetyssä menetelmässä silmut otetaan perjantaina aktiivihiltä sisältävälle 0,09 M sakkaroosi Murashige-Skoog-kasvatusalustalle (Murashige & Skoog 1962), kun taas mansikalle kehitetyssä menetelmässä silmut otetaan maanantaina 0,25 M sakkaroosi Murashige-Skoog-alustalle, jossa ei ole aktiivihiltä. Koska pensashanhikille ei ole tehty kryokokeita aikaisemmin, kokeiltiin molempia menetelmiä riippuen silmujen eristämispäivästä. Työssä käytetyt alustat löytyvät liitteestä 3.

5.4. Sokerikäsittely

Korkealle sokeri- tai sorbitolipitoisuudelle altistamisen esikasvatusvaiheessa on jo pitkään tiedetty parantavan meristeemien selviytymistä kryosäilytyksessä (Niino, Sakai, Yakuwa & Nojiri 1992, 264). Nousevan sokerikonsentraation vaikutuksen on todettu auttavan kasvien selviytymistä nestetyppikokeista. Vadelmalla on testattu kryosäilytysmenetelmää erilaisilla sokerikonsentraatiokokeilla ja saatu tulokseksi, että asteittainen sokerikonsentraation nostaminen antaa paremman mahdollisuuden silmuille selvitä nestetyppikäsittelyistä kuin jos sokerikäsittely suoritetaan niin, että silmujen annetaan olla samalla sokerikonsentraatiolla yhtäjaksoisesti. Tutkimuksissa on todettu, että korkein 0,75 M sakkaroosi ei ole hyväksi, jos sitä annetaan heti ja suoraan. Vadelmalle tutkitussa menetelmässä paras käsittelytulos saatiin käytettäessä sokerikonsentraatioina 0,25 M, 0,5 M ja 0,75 M sakkaroosia nostamalla konsentraatiota

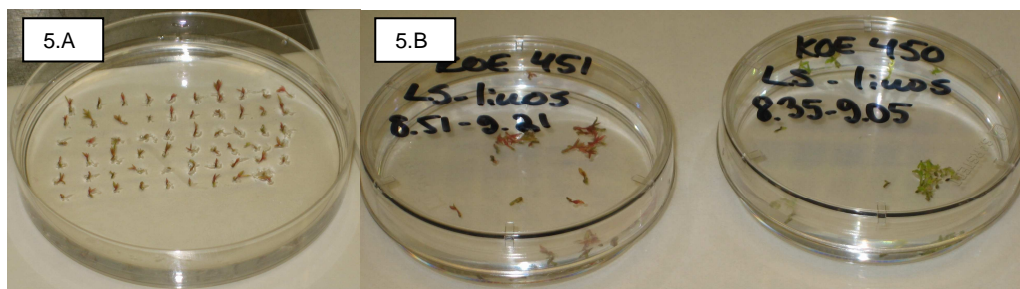
asteittain kolmen päivän ajan. (Wang, Laamanen, Uosukainen & Valkonen 2005, 283.)

Opinnäytetyössä suurimmat osat silmuista käsiteltiin normaalilla sokerikäsitteilyllä, jossa silmut olivat maanantaina 0,25 M sakkaroosi Murashige-Skoog-alustalla, tiistaina 0,50 M sakkaroosi Murashige-Skoog-alustalla ja keskiviikkona 0,75 M sakkaroosi Murashige-Skoog-alustalla. Poikkeuksena olivat ensimmäiset kaksi epäonnistunutta koesarjaa (E1 ja E2), joissa silmut olivat vain tavallisella fruktoosialustalla, ja viimeiset kokeet (D5 ja D6), joissa kokeiltiin, onko 0,75 M sakkaroosisokerikonsentraatio liian suuri ja vaikuttaako se tuloksiin heikentävästi. Tämän vuoksi osa kahdesta viimeisestä koesarjasta oli keskiviikkona vain 0,50 M sakkaroosisokerialustalla, eikä 0,75 M alustalla.

5.5. Vitrifikaatiokäsittely

Vitrifikaatiokäsittelyn ainut muuttuja oli PVS2-aika, joka vaihteli maanantaina suoritettujen kokeiden osalta 40–60 minuutin välillä. Perjantaina suoritettujen kokeiden PVS2-ajan vaihteluväli oli 35 minuutista 60 minuuttiin. Muuten menetelmä pyrittiin suorittamaan samalla tavoin muiden muuttujien osalta. Vitrifikaatiokäsittely suoritettiin aina torstaina, jolloin maanantaina eristetyt silmut olivat olleet eri maljoilla noin kolme päivää ja perjantaina eristetyt noin kuusi päivää (kuvio 5.A).

Aluksi pakastettavat silmut laitettiin latausliuokseen (LS-liuos) 30 minuutiksi (kuvio 5.B), jonka jälkeen silmut siirrettiin suodatinpaperille ja siitä PVS2-liuokseen ennalta päätetyiksi ajoiksi (35–60 minuutiksi). Tämän jälkeen silmut nostettiin yksitellen alumiinifolioliuskoille, joihin muodostui pisara PVS2-liuoksesta. Liuskat siirrettiin kryoputkiin ja pakastettiin. Poikkeuksena on kontrollinäyte (-LN-koe), johon pipetoitiin välittömästi 1 M sakkaroosia 2 millilitraa, annettiin vaikuttaa 30 minuuttia pimeässä folion alla ja siirrettiin suodatinpaperin kautta fruktoosikasvatusalustalle pimeään. Jokaiselle käsittelyerälle tehtiin lähes poikkeuksetta nestetyppeen menevät näyteputket (+LN-putket) ja kontrollinäyte (-LN-putki). Työssä käytettyjen vitrifikaatioliuosten koostumukset on esitetty liitteessä 3.



KUVIO 5. Maljakäsittelyt. 5.A 'Elizabeth'-lajikkeesta otetut silmut sokerimaljalla. 5.B Latausliuos käsittely 'Elizabeth' kokeella 451 = E5 eli viidennellä Elizabeth koe-erällä ja 'Tervola' kokeella 450 = T3 eli kolmannella Tervola koe-erällä.

5.6. Pakastus ja sulatus

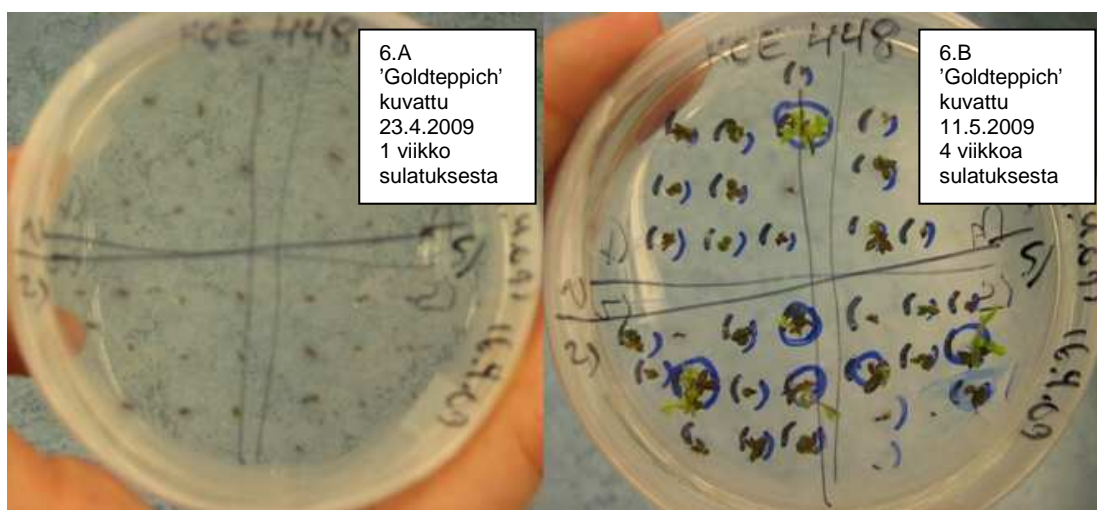
Yleisin kerralla pakastettavien silmujen määrä oli 30 kappaletta, jotka sitten jaettiin kolmeen eri putkeen. Kaksi näistä oli nestetyppeen meneviä ja yksi oli kontrolliputki. Pakastus suoritettiin välittömästi, koska PVS2-käsittely jatkuu kunnes putki on nestetypessä tai, kunnes siihen pipetoidaan sakkaroosiliuos niin kuin kontrollikokeessa tehdään. Pakastus suoritettiin aina samalla tavoin, paitsi ajanpuutteen vuoksi kokeiltiin myös kerran yhdessä koesarjassa 20 kappaleen pakastusta yhteen putkeen, jonka vuoksi koesarjassa T2 kuitenkin poikettiin hieman suoritusmenetelmästä ja otettiin noin 20 kappaletta silmuja yhteen pakastettavaan putkeen tavallisesta 10 kappaleesta poiketen. Tämä menettelytapa ei kuitenkaan onnistunut toivotulla tavalla ja samanlaisia kokeiluita ei tehty myöhemmin.

Jotta välttyttäisiin kasvin stressaamiselta ja haitallisilta vaikutuksilta, on todettu nopean sulatuksen olevan parempi menetelmä kuin hitaan sulatuksen. Nopea sulatus suoritettiin siirtämällä nestetypessä oleva kryoputki $+40^{\circ}\text{C}$:seen vesihauteeseen 3 minuutiksi. Tämän jälkeen vietiin putki nopeasti laminaarivirtauskaappiin, pyyhittiin se desinfiointialkoholilla ja suoritettiin sulatus niin kuin kontrollikokeelle tehtiin vitrifikaatiokäsittelyn yhteydessä.

5.7. Kasvin eloonjäämisen ja kasvuunlähdön havainnointi

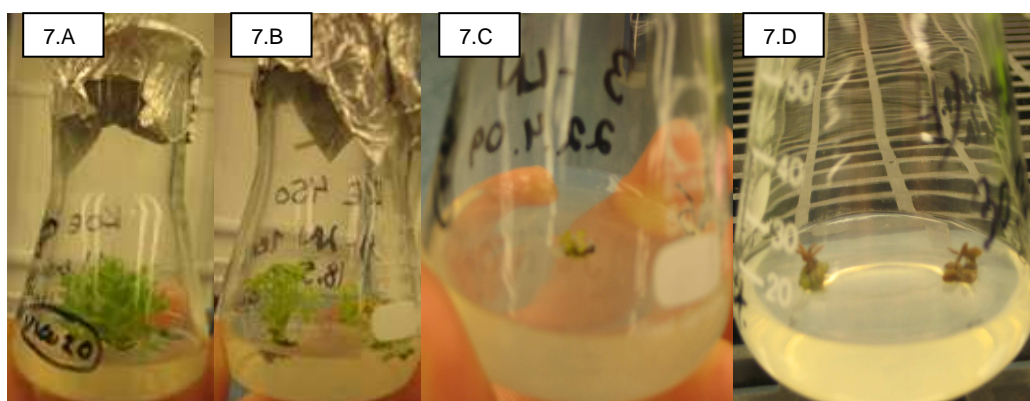
Sulatettuja näytteitä pidettiin pimeässä folion alla noin kolme päivää. Eli torstaina sulatetut näytteet otettiin pois folion alta maanantaina iltapäivällä kello 14.00 aikoihin ja laitettiin vielä kahdeksi päiväksi harson alle.

Harson pois ottamisen jälkeen pystyttiin tarkastelemaan näytteitä silmämääräisesti, mutta tarkemmat havainnoinnit täytyi aluksi suorittaa mikroskoopilla, koska silmut olivat niin pieniä ja viherrystä ei välttämättä havainnut paljain silmin (kuvio 6.A). Ensimmäiset havainnot kannatti tehdä vasta kahden viikon päästä sulatuksesta, koska ensimmäisellä viikolla havainnoinnista ei ole hirveästi hyötyä, sillä silmut ovat vielä niin pieniä. Näytteitä kannatti havainnoida tästä lähtien ainakin kahden viikon välein. Neljän viikon välein silmut siirrettiin uudelle fruktoosimaljalle ja ensimmäiset versootuneiden silmujen siirrot erlenmeyerkolveihin pystyttiin myös suorittamaan neljän viikon jälkeen sulatuksesta (kuvio 6.B). Näin aikaisessa vaiheessa siirroissa täytyy kuitenkin olla varovainen, ettei siirrä liian pieniä versoja erlenmeyerkolveihin. Liian pienenä siirretty silmu ei jaksaa kasvaa kolvissa ja kuolee. Kannattaa siirtää vasta tarpeeksi isot ja hyvännäköiset versot eteenpäin. Yleensä tämän havaitsee aika selvästi. Hyvännäköinen versova silmu on yleensä isompi, siinä on useita pitkiä verson haarautumia ja hyvä väri.



KUVIO 6. Maljojen havainnointi. 6.A. Aivan ensimmäisellä viikolla viherrys oli niin pientä, että kasvua ja viherrystä pystyi tarkastelemaan ainoastaan mikroskoopin alla. 6.B. Neljän viikon jälkeen sulatuksesta osa versovista silmuista voitiin siirtää erlenmeyerkolviin.

Erlenmeyerkolvissa olevat versot havainnoitiin neljän viikon päästä siirrosta ja luokiteltiin luokkiin 1.–4. Luokka 1. on iso, hyvänvärinen verso, joka on jaettavissa useammiksi uusiksi versoiksi. Luokka 2. on selkeästi pienempi kuin luokan 1. verso, mutta silti hyvännäköinen ja siitä saisi jakamalla tai jatkokasvattamalla jo viljelmän aikaiseksi. Luokkaan 2. voi joutua myös hyvänkokoinen, mutta muuten laadultaan heikompi verso. Esimerkiksi vesittyneisyys voi olla syy, että verso on luokkaa 2. luokan 1. sijaan. Luokka 3. on selkeästi heikko, ei hyvännäköinen verso, joka on yleensä pieni ja voi olla paljon ruskettunut, tosi vesittynyt tai muuten huono. Luokan 3. silmu ei mene jatkokasvatukseen. Luokkaan 4. luetellaan kaikki kuolleet silmut. (Ks. kuvio 7.A–D.)



KUVIO 7. Erlenmeyerkolvien havainnointi. 7.A Luokka 1. 'Elizabeth'-lajikkeen silmu, 7.B Luokat 1–2. 'Tervola'-lajikkeen iso silmu on luokkaa 1. ja pienet luokkaa 2., 7.C Luokka 3. Todella pieni silmu, jota ei oteta jatkoon. 7.D Luokka 4. kuolleita silmuja.

Sulatuksen jälkeen havainnointiin ja tulosten saamiseen kului aikaa vähintään 8 viikkoa, mutta suurin osa tuloksista vaati jopa 16 viikkoa ennen kuin saatiin lopullinen tulos selville.

6 TULOKSET

6.1. Yhteenveto kokeiden onnistumisesta

Ensimmäisenä menetelmää muokkaavana osatuloksena saatiin selville, että kärkisilmut lähtevät paremmin kasvuun kuin hankasilmut. Tämä havaittiin, kun selviytymiseen alkoi tulla suurta eroa käytettävästä silmutyypistä riippuen ja pystyttiin selkeästi havaitsemaan, että kärkisilmut selviytyvät paremmin kuin hankasilmut. Nestemäisessä työssä käyneiden kärkisilmujen selviytyminen oli lajikkeittain 'Elizabeth': 0–100 %, 'Goldteppich': 70–100 %, 'Dart's Cream': 30–100 % ja 'Tervola': 30–100 %. Hankasilmujen selviytyminen oli lajikkeittain 'Elizabeth': 0–50 %, 'Goldteppich': 35–85 %, 'Dart's Cream': 0–45 % ja 'Tervola': 25–30 %.

Kun saatiin huonoja tuloksia hankasilmujen selviytymisestä ja pienempien kokoluokkien 0,5–1 mm ja 1–2 mm selviytymisestä, päätettiin lopettaa kokeet niiden osalta kokonaan. Tähän päätökseen päädyttiin lisäksi siksi, koska kärkisilmut selvisivät ja lähtivät versomaan paremmin kuin hankasilmut. Pienimmän kokoluokan silmuja oli myös huomattavasti vaikeampi käsitellä kuin isompia. Tämä johti siihen, että saatiin menetelmää hiukan valmiimmaksi ja päätettiin ottaa ainoastaan kärkisilmuja kokoluokkaa 2–3 millimetriä. Pääasiassa eristetyt silmut olivat hieman yli 2 millimetriä pitkiä.

Käsittelyjen tuloksista pystyi myös jo alussa erottamaan kaksi kryokestävyydeltään vahvempaa ja kaksi heikompaa lajiketta. Vahvempia lajikkeita olivat 'Goldteppich' ja 'Tervola', kun taas heikompia olivat 'Elizabeth' ja 'Dart's Cream'. Menetelmää täytyi muokata heikoimpien lajikkeiden mukaan. Paras menetelmä on sellainen, jolla pystytäisiin tarvittaessa käsittelemään kaikkia neljää lajiketta ja selviytyminen olisi taattua. Mutta selviytyminen ei yksin riitä. Kasvin täytyy myös selviytymisen lisäksi lähteä versomaan ja uuteen kasvuun, jotta siitä olisi mahdollisuus saada uusi viljelmä. Niinpä lopullisena tuloksena pidettiin sitä kuinka hyvin lajikkeet lähtivät versomaan ja kuinka monesta saatiin uusi viljelmä. Viljelmä saatiin versoista, jotka olivat luokkaa 1. tai 2. erlenmeyer-kasvatuksen jälkeen.

Versominen ylsi tavoitteeksi asetetulle 30 % tasolle ainoastaan yhdellä lajikkeella. Lisäksi versominen oli heikompaa maanantaina eristetyillä silmuilla, verrattuna perjantaina eristettyihin silmuihin. Huono versominen ja heikko uusien viljelmien saaminen käynnistivät uudet lisäkokeet, joissa tutkittiin aktiivihillen ja 0,75 M sokerin vaikutusta. Nämä lisäkokeet suoritettiin ajanpuutteen vuoksi ainoastaan 'Dart's Cream'-lajikkeella. Lisäkokeiden tulokset esitetään myöhemmin PVS2-aikaan keskittyvässä tulososiossa.

6.2. Kokeiden yleiskuva lajikkeittain

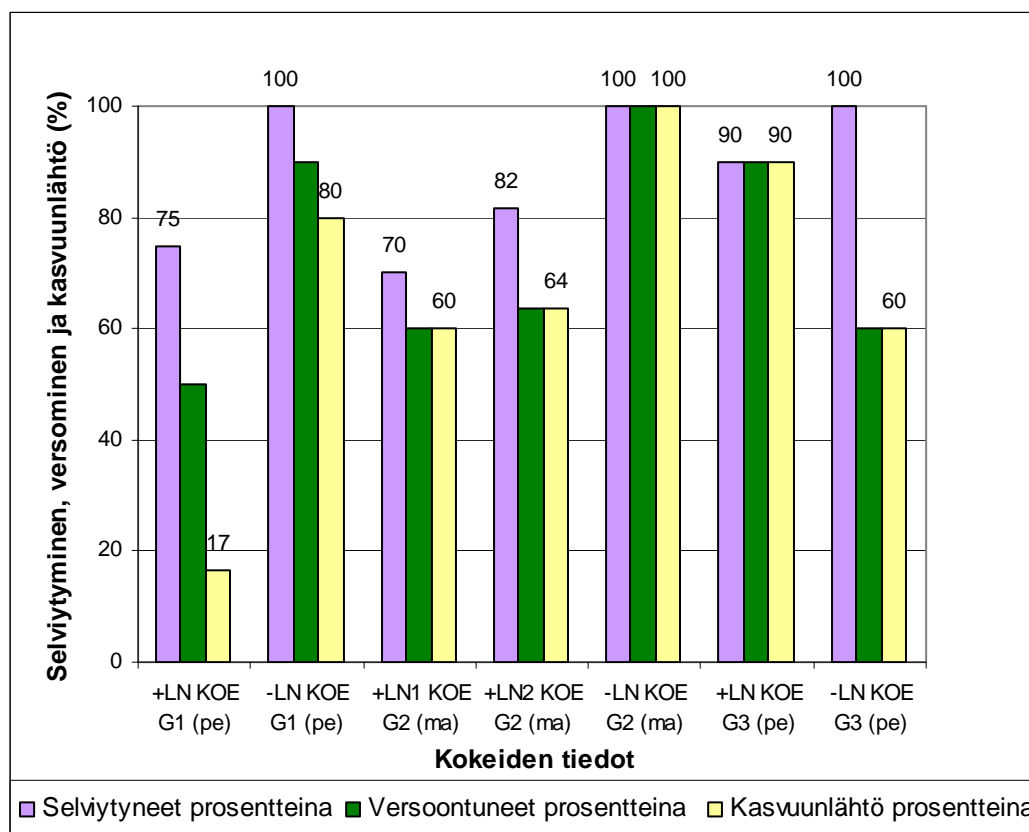
Kaikkien lajikkeiden selviytyneet, versoontuneet ja versovien silmujen kasvuunlähtö esitetään samalla vitrifikaatiokäsittelyllä, eli PVS2-ajan ollessa 45 minuuttia ja samaa kokoluokkaa 2–3 millimetriä olevilla kärkisilmuilla. Maanantain ja perjantain kokeita ei kuitenkaan eroteltu vielä tässä vaiheessa. Tuloksissa käsitellään nestemäisessä tyypessä käyneet kokeet (+LN) ja niiden kontrollikokeet (-LN), jotka eivät ole käyneet nestemäisessä tyypessä, mutta ovat muuten käyneet läpi saman prosessin. +LN-kokeista saadut tulokset kertovat kuinka hyvin silmut ovat kestäneet pakastus- ja sulatuskäsittelyt ja -LN-kokeista saadut tulokset kertovat taas, kuinka hyvin silmut ovat kestäneet vitrifikaatiokäsittelyn.

Tuloksista haluttiin saada selville selviytyminen ja versominen, sekä kuinka hyvin versovista silmuista saataisiin viljelmä. Selviytyminen saatiin selville, kun tarkasteltiin näytteitä sulatuksen jälkeen ja havaittiin viherrystä. Versominen saatiin selville myöhemmin, kun havaittiin kasvua silmuissa. Lopuksi versovista kokeista täytyi myös arvioida olisiko niistä saatu mikroviljelmä eli muodostivatko ne oikeanlaista hyvää kasvua. Hyvä ja oikeanlainen kasvu tarkoittaa, että kasvu ei ole kallusmaista eikä siinä esiinny vesittyneisyyttä. Kalluskasvu on kasvien aktiivisesti jakautuvaa erilaistumattomaa solukkoa ja se havaitaan epänormaalina kasvuna yleensä juuressa johon muodostuu paakkuja. Kalluskasvu lisää mahdollisuuksia geenimuunnokseen, jonka vuoksi se ei ole toivottua (Niino ym. 1992. 265).

Kryosäilytyksen lopullisena tavoitteena pidettiin, että saataisiin kolme hyvää viljelmää yhdestä erästä, jolloin voidaan valita parhain niistä jatkoon ja olisi varaa kontaminaatioillekin. Tämä tarkoittaa, että kymmenestä silmusta kolme kappaletta lähtee versomaan. Se vastaisi 30 prosentin versomista.

'Goldteppich'-lajike

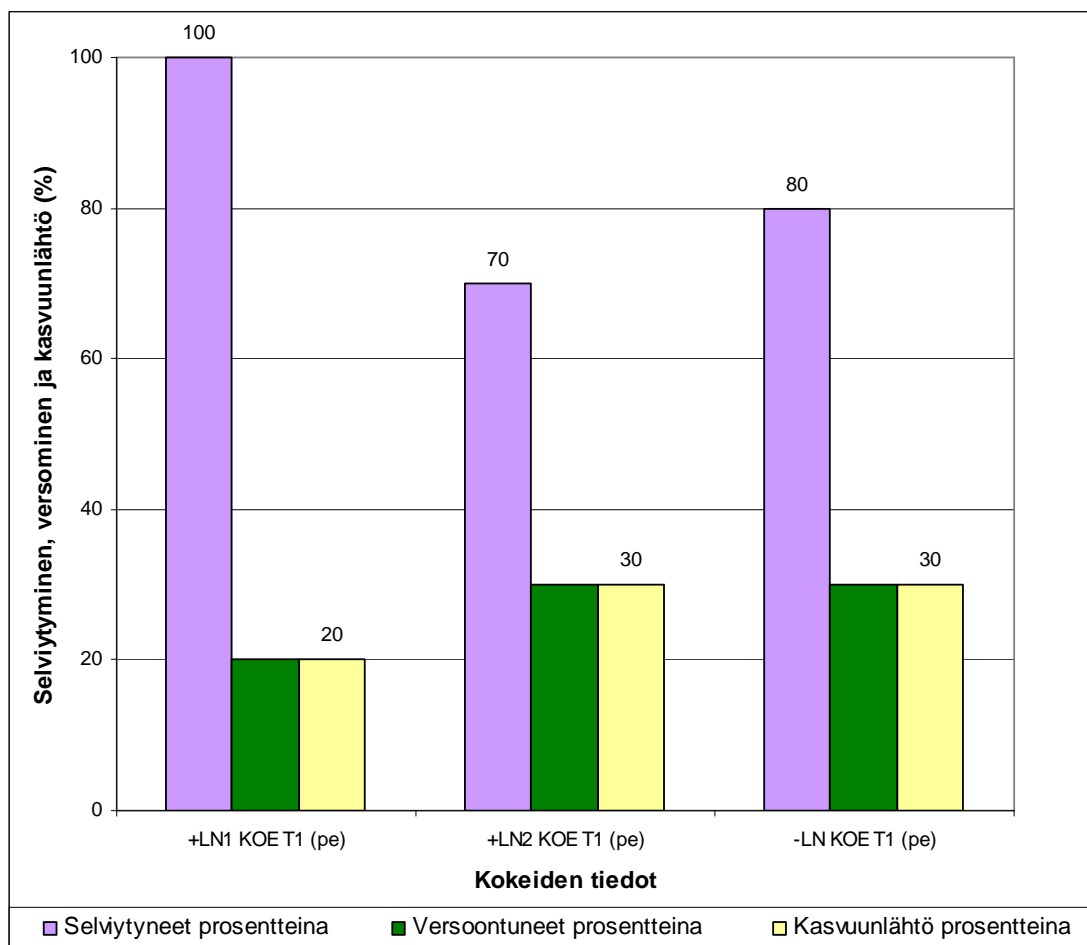
Kaikista pensashanhikkilajikkeista paras selviytyminen ja versominen saavutettiin 'Goldteppich'-lajikkeella. Tulokseksi saatiin, että silmujen selviytyminen oli neste-mäisessä työssä käyneissä + LN-kokeissa 70–90 prosenttia. Vastaavissa -LN-kokeissa silmujen selviytyminen oli 100 prosenttia. +LN-kokeiden silmut versoivat 50–90 prosenttisesti ja -LN-kokeiden silmut taas 60–100 prosenttisesti. Melkein kaikki versoneet silmut lähtivät myös hyvin kasvuun ja niistä olisi saatu uusi viljelelmä. G1-koesarjan neljännessä käsittelyssä on tapahtunut jotain, koska kasvuunlähtö on laske-
nut yli puolella. Kasvuunlähdon putoaminen johtuu selittämättömästä työssä tapahtu-
neesta virheestä, jonka vuoksi koe jouduttiin poistamaan tuloksista myöhemmässä
vaiheessa, koska se vääristi kuvaajia (kuvio 8).



KUVIO 8. 'Goldteppich' kärkisilmut pituus 2–3 mm ja PVS2-aika 45 minuuttia.

'Tervola'-lajike

Toiseksi parhaat tulokset saatiin 'Tervola' lajikkeella, vaikkakin 45 minuutin PVS2-aika kokeita sillä ei suoritettukaan kuin kolme kappaletta. Kaikki kolme koetta olivat hyvin onnistuneita ja niiden tulokset olivat todella hyvin rinnakkaisia keskenään. Selviytyminen oli 70–100 prosenttia. Versominen oli 20–30 prosenttia ja versovista silmuista kaikista saatiin uusi viljelmä (kuvio 9).



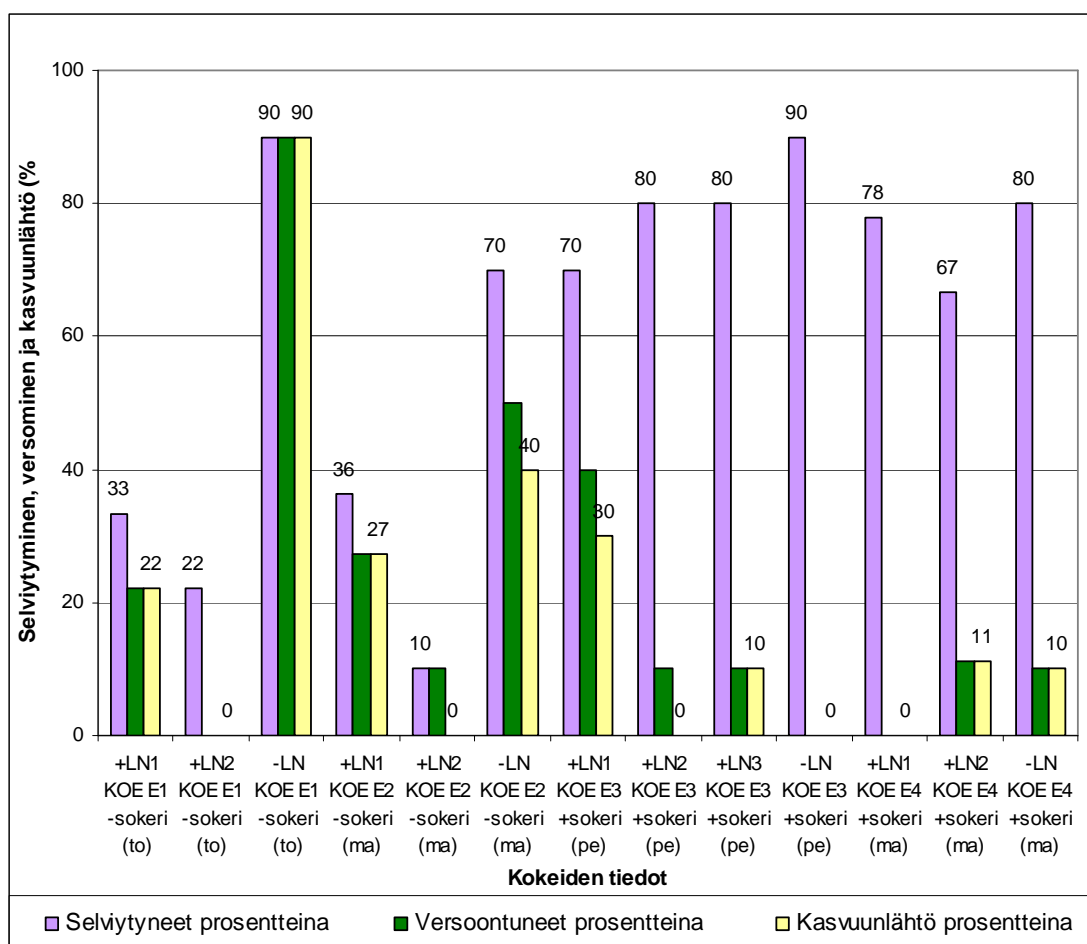
KUVIO 9. 'Tervola' kärkisilmut pituus 2–3 mm ja PVS2-aika 45 minuuttia.

'Elizabeth'-lajike

Kahdesta heikoimmasta lajikkeesta 'Elizabeth'-lajikkeella tulokset olivat toiseksi heikoimmat. Nestemäisessä työssä käyneiden kokeiden selviytyminen oli ilman portaitaisesti nousevaa sokerikäsittelyä (kokeet E1 ja E2) noin 10–40 prosenttia ja portaitaisella nousevalla sokerikäsittelyllä (muut kokeet) noin 65–80 prosenttia. Kontrollikokeet selviytyivät 70–90 prosenttisesti. Osalla nestemäisessä työssä käyneistä ko-

keista versominen oli todella heikkoa, vaikkakin joillakin kokeilla päästiin jopa 40 prosenttiseen versomiseen. Suurella osalla kokeista versomisen tulos oli 0 prosenttia.

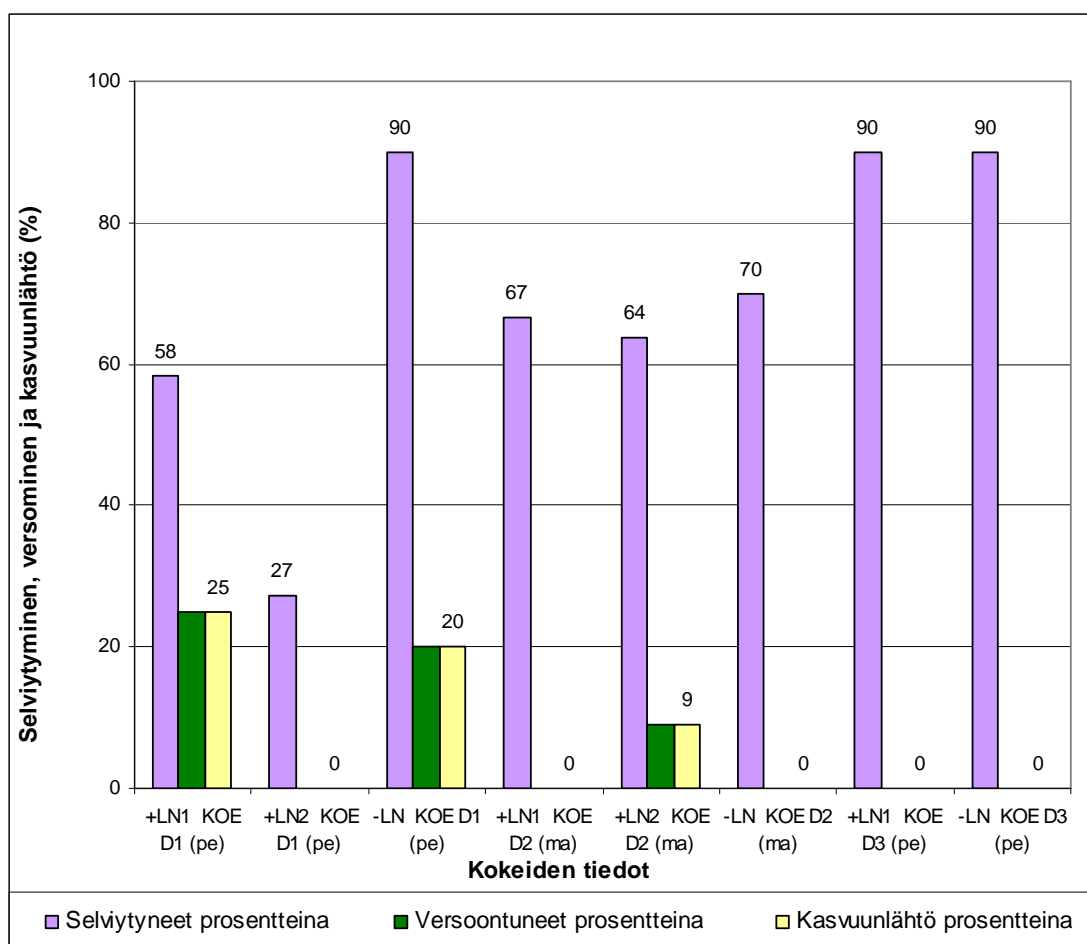
Kontrollikokeet jotka olivat saaneet sokerikäsittelyn, versoivat ainoastaan 10 prosenttisesti. Kontrollikokeet jotka eivät saaneet sokerikäsittelyä, versoivat 40–90 prosenttisesti. Niistä kokeista jotka lähtivät versomaan, saatiin melko hyvin myös viljelmä aikaiseksi, vaikkakin 10 prosentin häviötä tapahtui. Sokerikäsittelyn saaneet kokeet lähtivät huonommin versomaan, vaikka selviytyivätkin 50 % paremmin nestetyypikäsittelystä (kuvio 10).



KUVIO 10. 'Elizabeth' kärkisilmut pituus 2–3 mm ja PVS2-aika 45 minuuttia. Fruktoosikasvatusalustalla käyneet kokeet ovat -sokeri-kokeita, kun taas +sokeri-kokeissa on käytetty sakkaroosikasvatusalustoja niin kuin normaaleissa kryosäilytyskokeissa kuuluukin olla.

'Dart's Cream' -lajike

'Dart's Cream' osoittautui heikoimmaksi lajikkeeksi. Niinpä sillä tehtiin menetelmän testauksen viimeiseen vaiheeseen suuret lisäkokeet, joilla pyrittiin selventämään sokeiden ja aktiivihiilen vaikutusta kokeisiin. Normaaaleissa kokeissa tulokset olivat seuraavat. Selviytyminen vaihteli +LN kokeiden osalta 30–90 prosentin välillä. Vastaavat kontrollikokeet vaihtelivat 70–100 prosentin välillä. Versominen oli hyvin heikkoa ja vain kolme koetta osoitti versomista. Näistä kahdessa, nestemäisessä työssä käyneestä kokeesta toinen versoi noin 10-prosenttisesti ja toinen 25-prosenttisesti. Kontrollikokeista vain yksi versoi 20-prosenttisesti (kuvio 11).



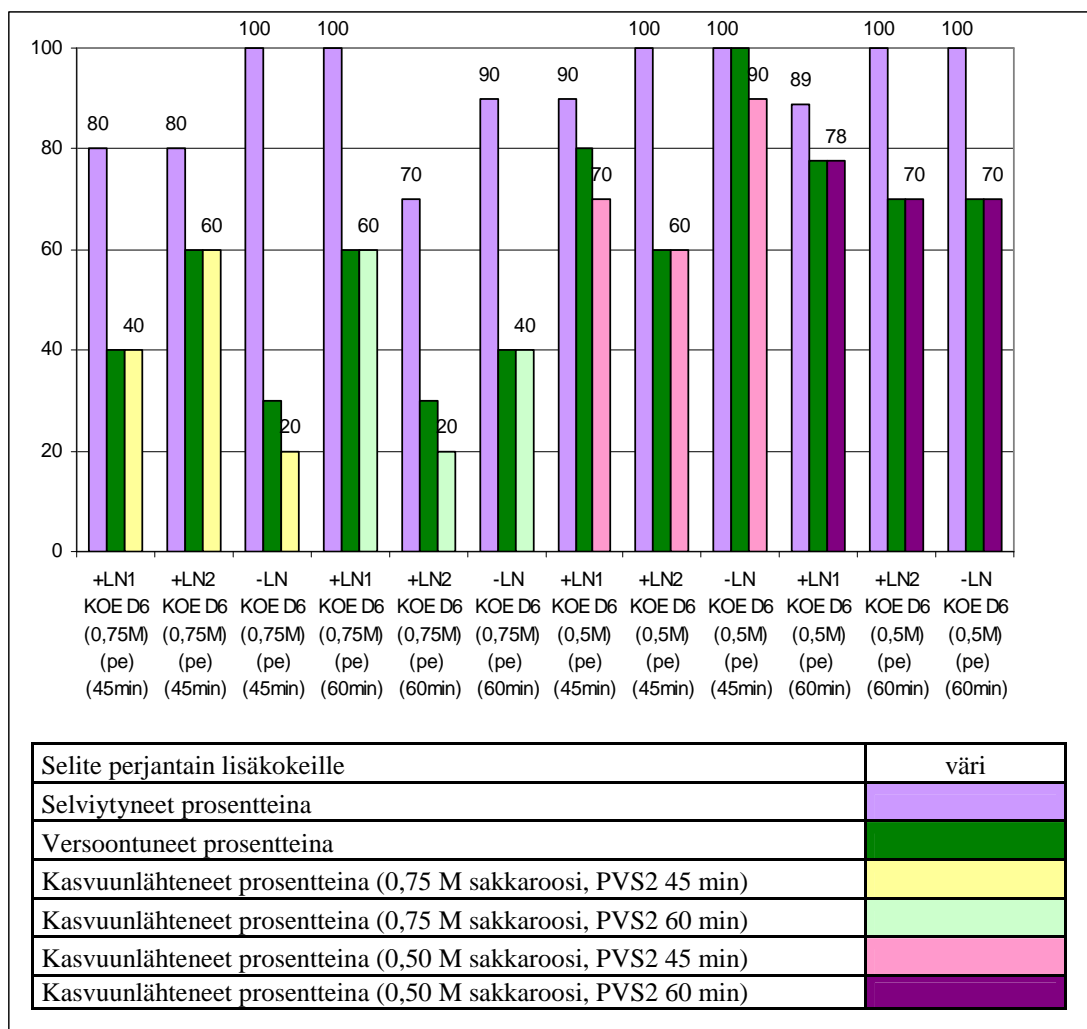
KUVIO 11. 'Dart's Cream' kärkisilmut pituus 2–3 mm ja PVS2-aika 45 minuuttia.

'Dart's Cream' -lajikkeen lisäkokeet

Lisäkokeissa kokeiltiin useita erilaisia menetelmävariaatioita, mutta päätavoitteena oli, että pyrittiin selvittämään syitä huonolle versomiselle ja kasvuunlähdölle. Kokeissa tutkittiin aktiivihillen ja sokereiden merkitystä, koska ne ovat tärkeitä osina kokeiden onnistumiselle. Lisäkokeita suoritettiin sekä perjantaina että maanantaina. Perjantain lisäkokeet olivat normaalin käsittelyn kaltaiset muilta osin, paitsi sokerikonsentraation ja PVS2-käsittelyn osalta. Lisäksi osalle kokeista ei tehty muuta kuin siirrettiin ne erilaisille maljoille ja seurattiin niiden kasvuunlähtöä. Näitä kokeita sanottiin 0-kokeiksi.

Lisäkokeiden rinnalla suoritettiin myös 30 kappaleelle silmuista normaali koeasetelma, jossa silmut käyvät kaikilla kolmella sokerimaljalla ja PVS2-aika oli 45 minuuttia ja 30 kappaleelle käsittely oli muuten normaali, mutta PVS2-aika oli 60 minuuttia. 60 kappaletta perjantaina eristettyjä silmuja otettiin aktiivihilimaljalle niin kuin normaalit kokeetkin, mutta ne eivät saaneet korkeinta sokerimaljakäsittelyä. 30 kappaletta näistä kokeista taas jaettiin 45 minuutin ja toiset 30 kappaletta 60 minuutin PVS2-käsittelyajalle. Lisäksi 40 kappaletta silmuista jaettiin 0-kokeisiin neljälle eri maljalle. Fruktoosimaljalle 10 kpl, aktiivihilimaljalle 10 kpl, 0,50 M sakkaroosimaljalle 10 kpl ja 0,75 M sakkaroosimaljalle 10 kpl.

Normaalilla koeasetelmalla päästiin 40–60 prosenttiseen versovien silmujen kasvuunlähtöön. Normaalilla koeasetelmalla, jossa PVS2-aikaa oli nostettu, päästiin 20–60 prosenttiseen kasvuunlähtöön. Kokeilla, joissa silmut eivät saaneet korkeinta sokeria ja PVS2-aikana oli 45 minuuttia, kasvuunlähtö oli 60–70 % ja kokeilla, joissa PVS2-aikana oli 60 minuuttia kasvuunlähtö oli jopa 70–78 %. Kontrollikokeista korkeimmalla sokerikonsentraatiolla silmut lähtivät kasvamaan 20–40 prosenttisesti ja kokeilla jotka eivät saaneet korkeinta sokeria 70–90 prosenttisesti (kuvio 12).



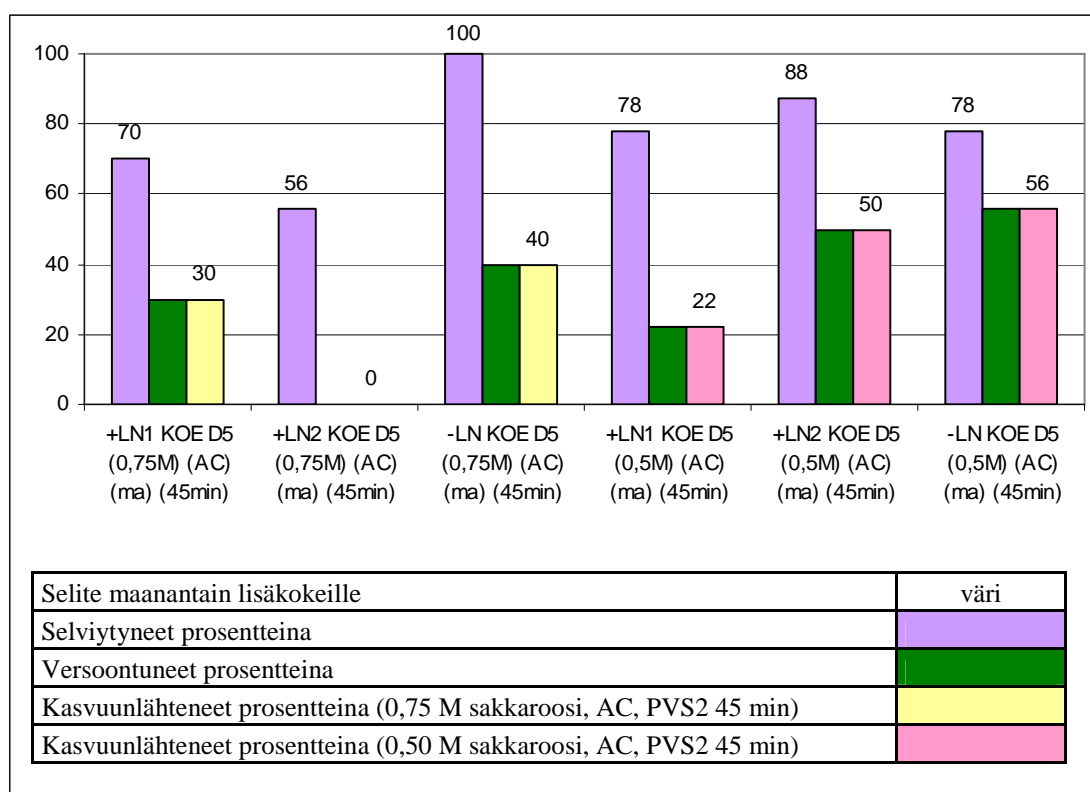
KUVIO 12. Perjantaina eristettyjen silmujen lisäkokeiden tulokset.

Kaikki 0-kokeet lähtivät versomaan melko hyvin ja suurta eroavaisuutta ei pystytty havaitsemaan. Versominen oli välillä 70–100 %. Sakkaroosimaljoilla silmut eivät jakaneet kasvaa yhtä hyvin kuin fruktoosi- ja aktiivihiihimäljoilla, mutta sakkaroosi on välttämätöntä silmuille nestetyppeen laittamisen vuoksi. Korkeimmalla sakkaroosikonsentraatiolla 0,75 M silmut kasvoivat ja versoivat heikoiten. Toteutetut 0-kokeet eivät näy kuviossa 12.

Maanantaina eristetyille silmuille kokeiltiin täysin erilaista menetelmää, missä silmut menevät asteittain nouseville sokerikonsentraatiomaljoille niin kuin normaalissa menetelmässä, mutta maljoihin on lisätty aktiivihiihtä. Maanantain kokeilla käytettiin vain normaalia 45 minuutin PVS2-käsittelyaikaa, mutta korkein sokerikonsentraatio vaihteli niin kuin perjantain lisäkokeissakin.

Maanantaina eristettyjä silmuja oli 90 kappaletta ja ne jakaantuivat kolmeen osaan. Yhdestä osasta tehtiin kokeilut korkeimmalla 0,75 M sakkaroosikonsentraatiolla, toisesta osasta vastaavat kokeilut 0,50 M sakkaroosikonsentraatiolla ja kolmannesta osasta tehtiin 0-kokeet.

Maanantain lisäkokeiden tuloksista ei havaittu merkittävää parannusta normaaliin menetelmään, vaikkakin selviytyminen parantui molemmilla nestetyyppeen menevillä sarjoilla. Maanantain kokeilla paras kasvuunlähtö saatiin 'Dart's Cream'-lajikkeelle menetelmällä, jossa silmut kävivät 0,25 M ja 0,50 M sakkaroosimaljoilla ja kasvatusalustaan oli lisättyä aktiivihiiltä. Silmujen versominen oli nestemäisessä työssä käyneistä kokeista parhaimmillaan 50 prosenttia (kuvio 13).



KUVIO 13. Maanantaina eristettyjen silmujen lisäkokeiden tulokset

Maanantain lisäkokeiden yhteydessä tehdyistä 0-kokeista saadut tulokset olivat perjantai-koekokeiden kanssa samanlaiset. Kasvuunlähtö oli 78–100 % ja heikoin 78 % versominen saatiin korkeimmalla sokerilla. Tehdyt 0-kokeet eivät näy kuviossa 13.

6.3. PVS2-ajan määrittäminen oikeaksi

Työn tärkeimpänä päämääränä oli luoda menetelmä, jota voitaisiin käyttää kaikille pensashanhikeille ja että menetelmää ei tarvitsisi muuttaa pakastettaessa eri lajikkeita pitkäaikaissäilytykseen. Menetelmässä yksi tärkeimmistä tekijöistä on PVS2-aika. Aika ei saa olla liian lyhyt, mikä aiheuttaisi sen että silmut eivät saa siitä riittävää hyötyä ja suojaa nestemäiseen tyypeen laitettaessa. Mutta aika ei myöskään saa olla liian pitkä, koska PVS2-liuos on myrkyllistä kasveille jos ne altistetaan sille liian pitkäksi aikaa. Oikean ajan määrittämiseksi on tehtävä kokeita ja seurattava kuinka silmut selviävät kokeista ja ennen kaikkea alkavat versoa kokeiden suorituksen jälkeen.

Ajan määrittäminen ei ole itsestään selvä ja helppo asia, koska siihen vaikuttaa moni tekijä, kuten ensinnäkin se minä päivänä silmut on otettu. Perjantaina otetut silmut saattavat kasvaa maljalla ja näin ollen ne vaatisivat PVS2-ajan muuttumisen saadakseen optimaalisesti oikean käsittelyn. Silmun koko nimittäin vaikuttaa suuresti PVS2-aikaan. Pienet silmut eivät tarvitse yhtä pitkää aikaa kuin kaksi kertaa suuremmat silmut. PVS2-aikaan vaikuttaa myös, mikä pensashanhikilajike on kyseessä. Niinpä ei voidakaan tyytyä aikaan missä tulos olisi paras vain yhdellä lajikkeella vaan on pystyttävä tekemään kompromissi, jossa jokaista lajiketta pystyttäisiin tietyllä varmuudella säilyttämään niin, että siitä olisi mahdollista saada viljelmä.

PVS2-ajan määrittämiseksi aikakokeiluja olisi ehkä pitänyt tehdä hieman enemmän ja tuloksen varmistamiseksi olisi myös tarpeen suorittaa kokeille toistoja, mutta neljällä lajikkeella saadut tulokset antavat jo suuntaa siitä mitä voidaan odottaa. Koska kryosäilytysmenetelmässä on monta kriittistä vaihetta ja käsiteltävä materiaali on elävää, tulosta täytyy katsoa sillä silmällä, että jokainen koe ei välttämättä anna aivan täsmällistä tulosta vaan tulos elää hieman ja sen suuntaa voidaan päätellä kokeista saatujen tulosten perusteella.

6.4. Yhteenveto PVS2-ajan optimoinnista

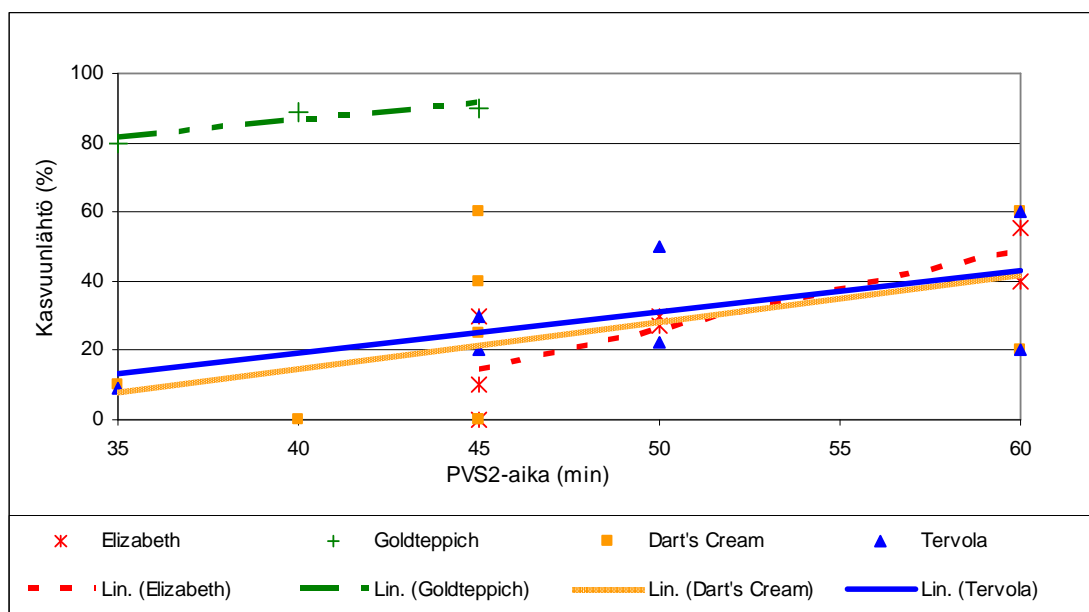
Menetelmän PVS2-aikaa täytyy miettiä erikseen, myös sen mukaan kumpana päivänä tehdään silmujen ottaminen. Jos halutaan yhtenäinen menetelmä pensashanhikeille, on tyydyttävä kompromissiin parempien lajikkeiden osalta. Heikoiten lähtevät lajikkeet määräävät PVS2-ajan.

Yhtenäiseen menetelmään valitaan mieluummin silmujen eristämispäiväksi perjantai-päivä. Tähän päädyttiin sen perusteella, että perjantain kokeet onnistuivat maanantain kokeita paremmin ja etenkin, koska maanantaina eristetyistä silmuista 'Tervola'-lajikkeella saatu tulos jäi erittäin heikoksi. Jos haluttaisiin käyttää maanantaita silmujen ottamispäivänä, täytyisi menetelmää vielä hieman kehittää.

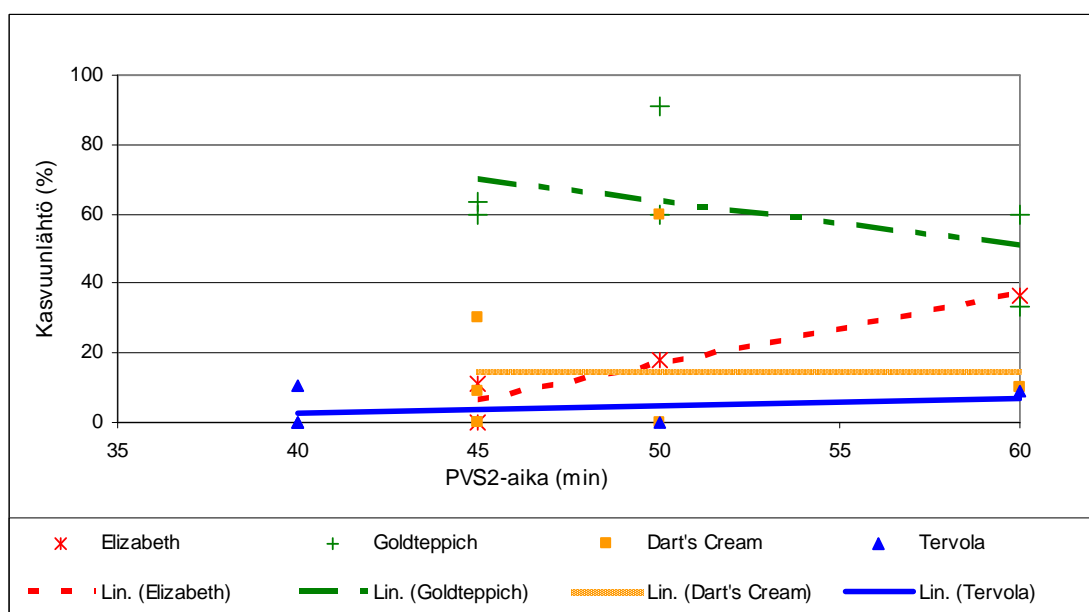
Tulokset eivät ole yhtenäisiä, koska kaikilla lajikkeilla samoja aikoja ei ole tutkittu. Yhtenäisessä menetelmässä PVS2-käsittelyaikana käytettäisiin kuitenkin 60 minuuttia. Kun tehdään kokeita, todelliseen vaikutusaikaan tulee hieman lisää aikaa, koska PVS2-liuoksen annetaan ensin vaikuttaa käsittelyaika ja sitten tehdään siirto, jonka aikana liuos kuitenkin vaikuttaa yhä edelleen. Eli parasta olisi jos annettaisiin liuoksen vaikuttaa 60 minuuttia, jonka jälkeen tehtäisiin siirrot. Vaikutusaikaan tulee siis vielä lisääaikaa sen verran kuin siirtojen suorittamiseen menee aikaa. Koska PVS2-liuos on pitemmällä vaikutusajalla haitallista kasveille, aikaa ei kannata turhaan pitkittää.

Kaikilla lajikkeilla perjantain käsittelyissä PVS2-ajan pidentäminen paransi lopputulosta. Tämä todettiin lopulta myös kun suoritettiin 'Dart's Cream' -lajikkeen lisäko-keet, joissa pyrittiin selvittämään aktiivihiiilen ja sokerien merkitystä. Kaikista lajik-keista poikkeavin oli kuitenkin 'Goldteppich'-lajike, jonka tulokset näyttivät siltä, että ne alkaisivat heiketä käsittelyn pidetessä. Tämän sai aikaan ensimmäisessä 'Goldtep-pich'-lajikkeella suoritetusta kokeesta saatu huono tulos. Tulos hylättiin koska se vää-risti kuvaajaa. Kolme muuta suoritettua koetta ovat yhtenäiset ja kertovat siis siitä, että ne ovat onnistuneet ja hylätty koe oli jollakin tavoin epäonnistunut. 'Goldteppich'-lajikkeella saatiin huomattavasti parempia yli 80 % kasvuunlähtemisiä kuin muilla lajikkeilla. 'Tervola', 'Elizabeth' ja 'Dart's Cream' lajikkeilla saatiin korkeimmillaan 60 % kasvuunlähtemisiä. Lisäksi tulokset olivat perjantain käsittelyjen osalta yhtenäi-

set ja niissä ei keskimääräisesti havaittu suurta vaihtelua (kuvio 14). Maanantaina eristettyjen silmujen tulokset vaihtelivat laajasti ja se kertoo, että aktiivihieillä on siis merkitystä kasvuunlähtöön. Maanantain tulokset eivät olleet yhtenäiset ja tarpeeksi hyvät, jotta niiden perusteella olisi saatu menetelmä aikaiseksi (kuvio 15).



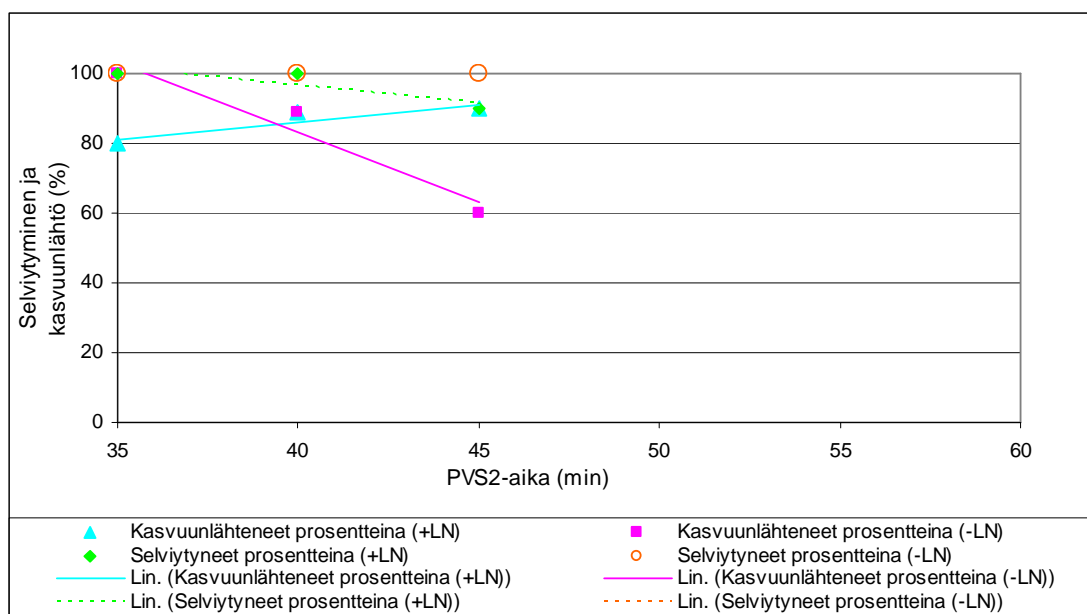
KUVIO 14. Perjantaina eristettyjen silmujen kasvuunlähtö lajikkeittain eri PVS2-ajoilla +LN-kokeista.



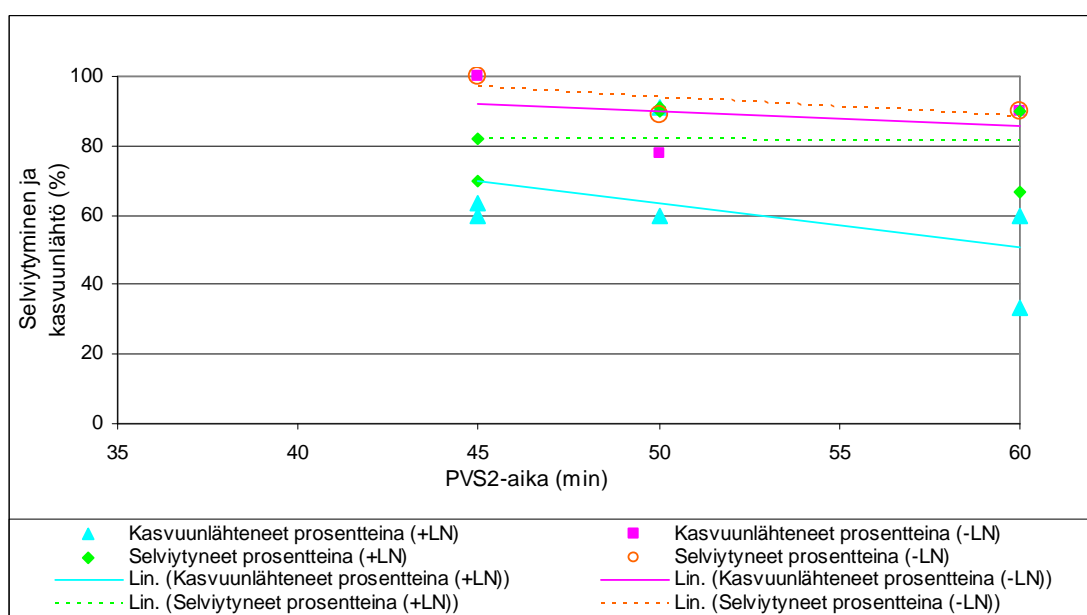
KUVIO 15. Maanantaina eristettyjen silmujen kasvuunlähtö lajikkeittain eri PVS2-ajoilla +LN-kokeista.

PVS2-aika 'Goldteppich'-lajikkeella

Lajikkeelle tehtiin PVS2-aikakokeita maanantaina ja perjantaina. Perjantain ajat olivat 35, 40 ja 45 minuuttia ja näistä parhain tulos oli 45 minuutin käsittelyajalla (kuvio 16). Maanantain ajat olivat 45, 50 ja 60 minuuttia. Maanantain kokeilla paras PVS2-aika oli 45 tai 50 minuuttia. 45 minuutilla -LN-kokeiden lopullinen kasvuunlähtö oli 100 %, mutta paras tulos (noin 90 %) +LN-kokeilla saavutettiin 50 minuutin PVS2-käsittelyajalla (kuvio 17).



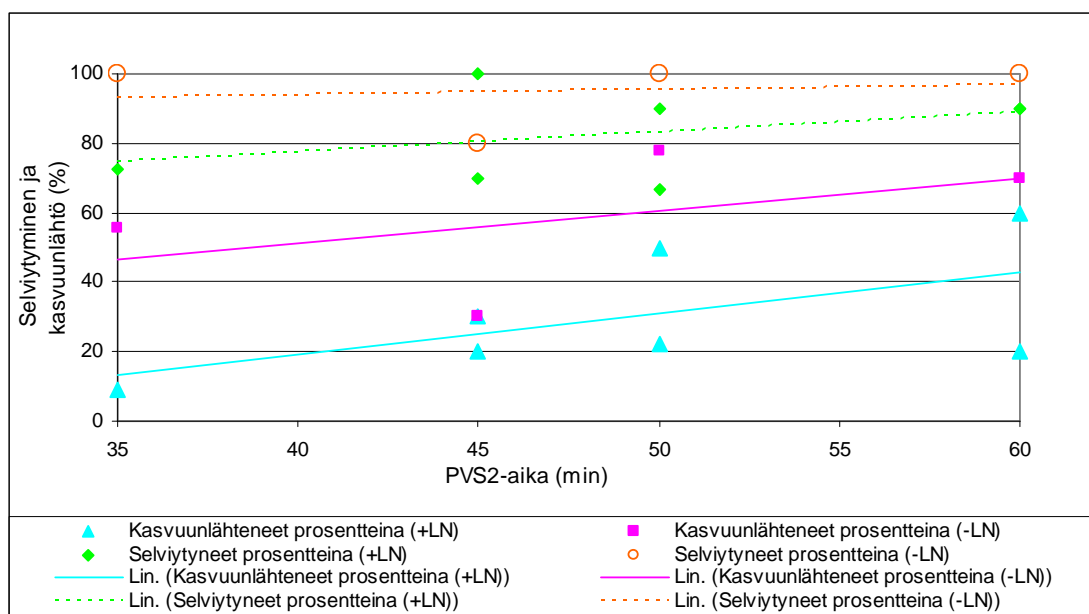
KUVIO 16. 'Goldteppich'-lajikkeen perjantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset. Silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö.



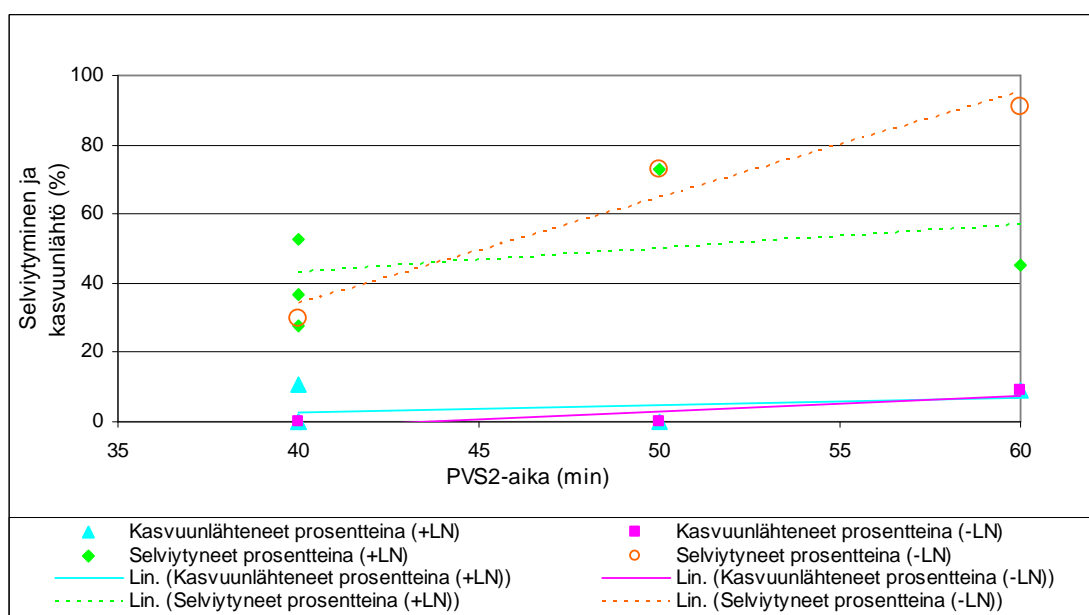
KUVIO 17. 'Goldteppich'-lajikkeen maanantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset. Silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö.

PVS2-aika 'Tervola'-lajikkeella

Lajikkeen tulokset vaihtelivat maanantain ja perjantain kokeiden välillä merkittävästi. Perjantain PVS2-ajat olivat 35, 45, 50 ja 60 minuuttia. Paras versominen aikaansaatiin 60 minuutilla (kuvio 18). Maanantain PVS2-ajat olivat 40, 50 ja 60 minuuttia. Paras tulos maanantain kokeilla saatiin lyhyimmällä 40 minuutin käsittelyllä, mutta myös 60 minuutin käsittely johti melkein samaan tulokseen. Maanantain kokeiden tuloksista ei voida päätellä paljoa, koska kaikki kokeet ovat melkein nollatuloksia (kuvio 19).



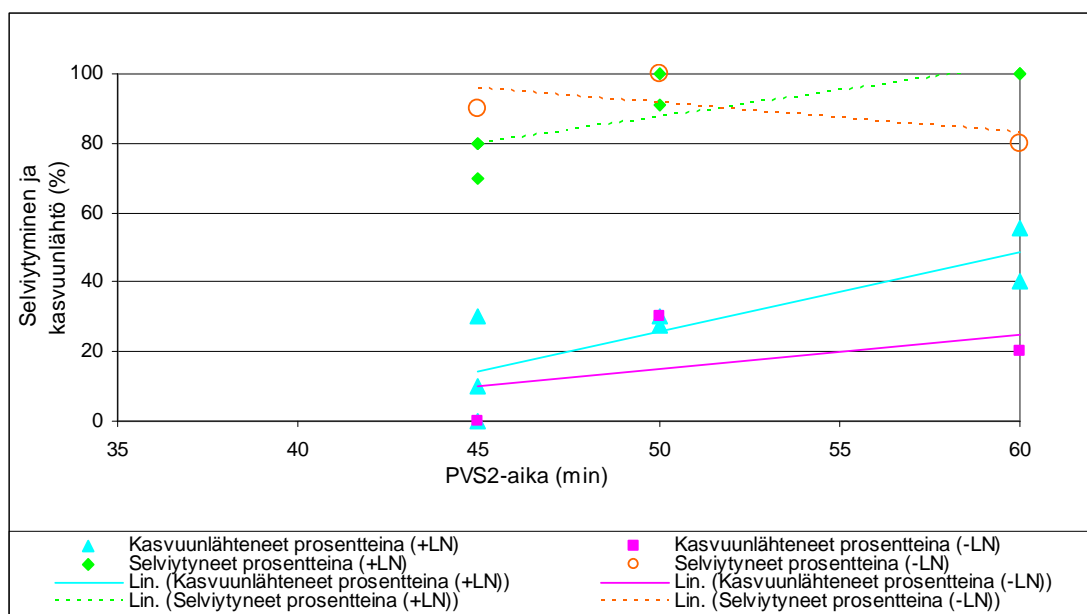
KUVIO 18. 'Tervola'-lajikkeen perjantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset. Silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö.



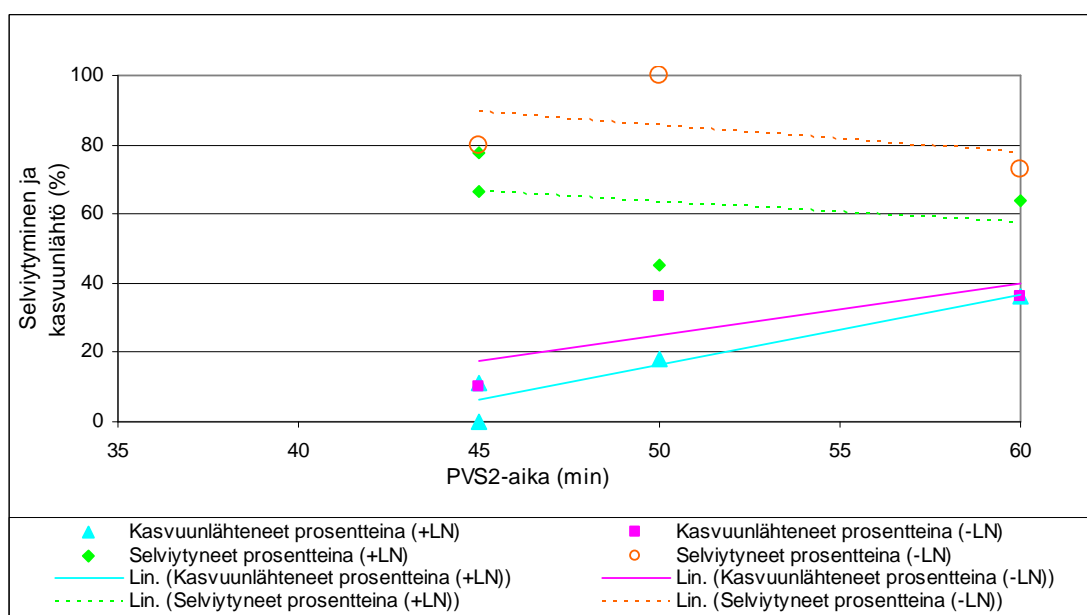
KUVIO 19. 'Tervola'-lajikkeen maanantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset. Silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö.

PVS2-aika 'Elizabeth'-lajikkeella

Lajikkeella maanantain ja perjantain kokeiden välillä oli vain hieman vaihtelua ja tämä oli poikkeavaa verrattuna muihin lajikkeisiin. Maanantain kokeet eivät onnistuneet yhtä hyvin kuin perjantain kokeet. Perjantain kokeiden ajat olivat 45, 50 ja 60 minuuttia ja paras tulos saatiin korkeimmalla ajalla (kuvio 20). Maanantain kokeilla PVS2-aikoina käytettiin 45, 50 ja 60 minuuttia. Paras tulos saatiin pisimmällä 60 minuutin PVS2-käsittelyajalla (kuvio 21).



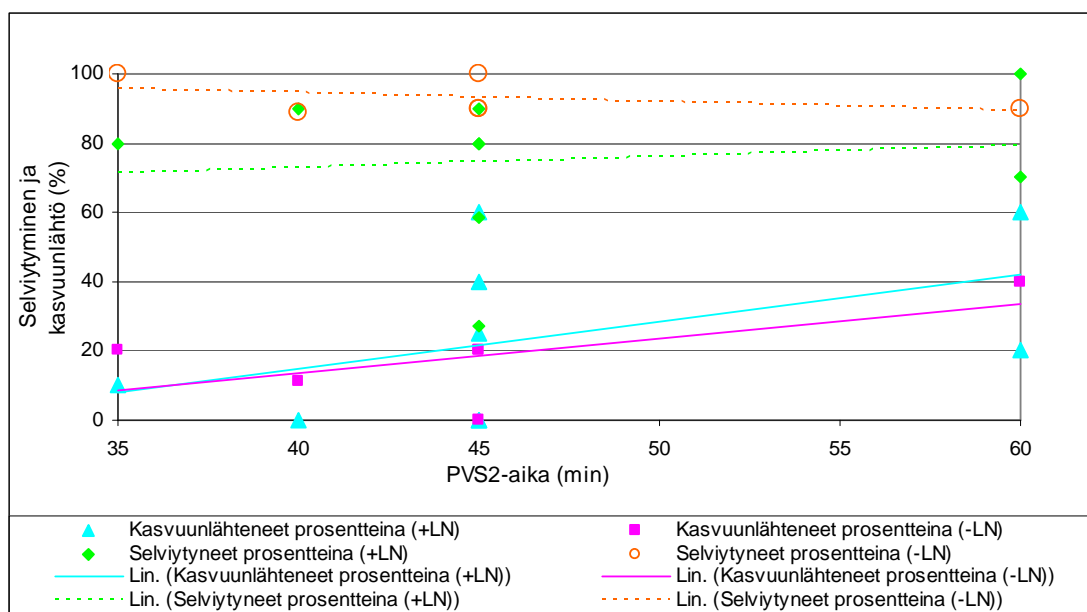
KUVIO 20. 'Elizabeth'-lajikkeen perjantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset. Silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö.



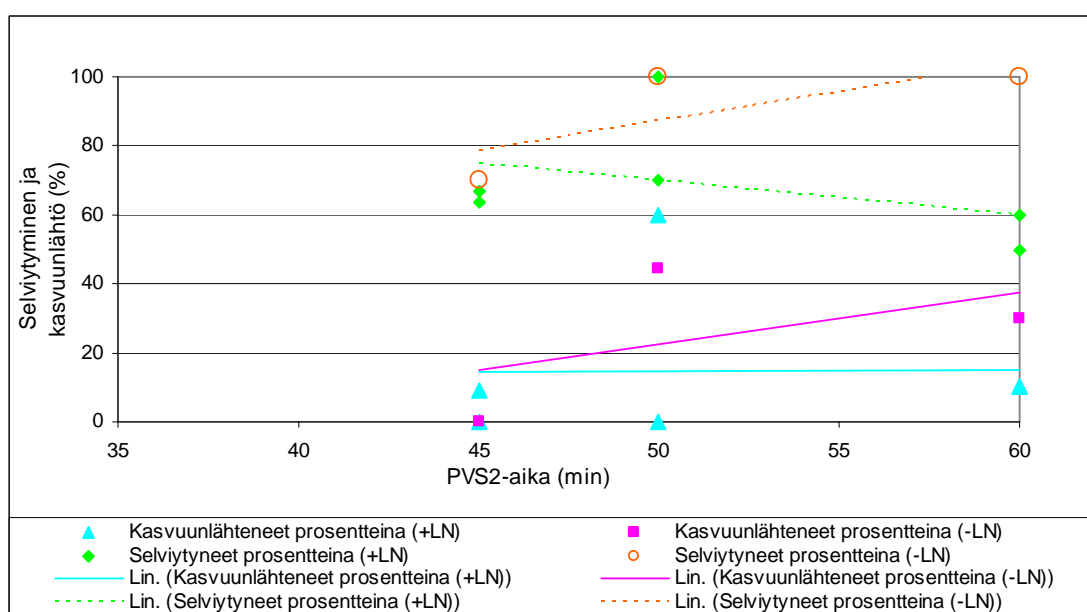
KUVIO 21. 'Elizabeth'-lajikkeen maanantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset. Silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö.

PVS2-aika 'Dart's Cream' -lajikkeella

Lajikkeen perjantain kokeissa käytettiin aikoina 35, 40, 45 ja 60 minuuttia. 'Dart's Cream' -lajikkeella tuloksissa oli eniten heittelevyyttä ja tuloksista oli aluksi vaikea saada selvää. Viimeisten lisäkokeiden ansiosta saatiin kuitenkin selville, että pisimmällä 60 minuutin ajalla selviytyminen oli parempaa, kuin muilla ajoilla (kuvio 22). Maanantain PVS2-aikoja olivat 45, 50 ja 60 minuuttia. Maanantain kokeiden paras versominen oli 50 minuutin kohdalla (kuvio 23).



KUVIO 22. 'Dart's Cream' -lajikkeen perjantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset. Silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö.



KUVIO 23. 'Dart's Cream' -lajikkeen maanantaisten PVS2-käsittelyjen tulokset. Silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö.

6.5. Sokerien vaikutus

Sokerit vaikuttavat merkittävästi kryokokeisiin. Sokereita tarvitaan, jotta silmut selviäsivät pakastuksesta. Tämä selvisi jo ensimmäisistä 'Elizabeth'-lajikkeella tehdyistä kokeista. Ensimmäiset kaksi koetta (E1 ja E2) tehtiin vahingossa väärin, jonka vuoksi niiden selviytyminen on heikkoa. Nämä kokeet olivat tavallisella fruktoosikasvatusalustalla, joten ne olivat -sokeri-kokeita. Fruktoosialusta poikkeaa sakkaroosipitoisuudeltaan korkeammista sakkaroosisokerialustoista ainakin siinä määrin, että siinä silmuista ei poistu vettä. Jos silmuihin jää paljon vettä se on haitallista pakastusvaiheessa, kun muodostuva jää hajottaa silmuja. Tämä aikaansaa heikomman selviytymisen ja versomisen. Kryokäsittelyjä edeltävät sokerikäsittelyt tehdään käyttämällä sokerina sakkaroosia. Niinpä seuraavat kokeet ovat saaneet normaalin korkean sakkaroosisokerikäsittelyn, joten ne olivat kaikki +sokeri-kokeita. Näissä kokeissa selviytyminen pakastuskäsittelyistä oli jo selkeästi parempaa. Tästä voitiin todeta, että sokerit parantavat selviytymistä nestetyypikäsittelyissä.

Viimeisissä kokeissa selvitettiin onko korkea sokerin määrä kuitenkaan hyväksi vai heikentääkö se tulosta. Kaikki kasvit eivät välttämättä tarvitse niin paljon sokeria kuin mitä korkeimmassa sokerialustassa on. Tätä pyrittiin selventämään suorittamalla 'Dart's Cream'-lajikkeella lisäkokeita. Kokeissa selvitettiin korkeimman 0,75 M sakkaroosin ja sitä alemman 0,50 M sakkaroosin vaikutuksia silmuihin. Tulos oli selkeä ja se havaittiin jo 0-kokeissa eli kokeissa, jotka kuvaavat vain silmujen kasvamista erilaisilla alustoilla. Alustoina käytettiin normaalia fruktoosikasvatusalustaa, aktiivihiilialustaa ja 0,50 M ja 0,75 M sakkaroosialustoja. Fruktoosi- ja aktiivihiilialustalla silmut versoivat 100-prosenttisesti ja kasvuunlähtö heikkeni huomattavasti käytettäessä 0,5 M ja 0,75 M sakkaroosialustoja. Heikoin tulos saatiin korkeimmalla 0,75 M sakkaroosialustalla (kuvio 24).



KUVIO 24. Sokerikäsittelyjen vaikutus. 1–3 Kolmesta maanantaina tehdystä 0-kokeesta, jossa silmut saivat samanaikaisesti aktiivihiiltä, ei huomaa sokerin haittavaikutusta. 1. oli fruktoosialustalla kasvanut silmu. 2. oli 0,5 M sakkaroosialustalla kasvanut silmu. 3. oli 0,75 M sakkaroosialustalla kasvanut silmu. 4–7 Perjantaina tehdystä 0-kokeista, jossa silmut saivat aktiivihiiltä eri aikaan kuin sokereita vaikutuksen pystyy huomaamaan. Haittavaikutus havaitaan erlenmeyerkolveissa 5 ja 6, joissa sokerimaljoille siirretyt silmut eivät ole kasvaneet yhtä tuuheiksi ja hyvännäköisiksi tuppaiksi. 4. oli fruktoosimaljalla kasvanut silmu. 5. oli 0,5 M sakkaroosialustalla kasvanut silmu. 6. oli 0,75 M sakkaroosialustalla kasvanut silmu. 7. oli aktiivihiilimaljalla kasvanut silmu.

Nestetyössä käyneistä kokeista 0,75 M sokerialustalla olleet silmut olivat selkeästi huonomman näköisiä kuin vastaavat 0,50 M sokerialustalla olleet silmut. Kaikista suoritetuista sokerikäsittelykokeista voidaan päätellä, että korkein sokeri on enemmän haitaksi kuin hyödyksi pensashanhikeille ja että toiseksi korkein 0,50 M sokerialusta on parempi vaihtoehto pensashanhikkien kryosäilytykseen.

6.6. Aktiivihiilen merkitys

Aktiivihiilen on todettu parantavan silmujen kestävyyttä erilaisia myrkkyvaikutuksia vastaan. Siitä pitäisi siis olla vain hyötyä kokeissa. Maanantain ja perjantain kokeita ei voi verrata toisiinsa koska perjantaina otetut silmut otetaan aktiivihiilimaljalle ja ne ovat tässä maljalla kolme päivää kauemmin kuin mitä maanantaina otetut silmut. Tuona aikana varsinkin kärkisilmut kasvavat pituutta.

Aktiivihiilen merkitystä selvitettiin viimeisissä kokeissa 'Dart's Cream' -lajikkeella. Osa kokeista tehtiin maanantaina ja osa perjantaina. Aiemmista kokeista oli saatu selville, että maanantaina eristettyjen silmujen selviäminen ja versominen olivat heikompia kuin perjantaina eristettyjen. Koska maanantain kokeiden onnistuminen oli niin

heikkoa, pyrittiin selvittämään olisiko maanantain kokeille hyödyksi jos silmut saisivat aktiivihiihtä lisättynä sokerialustoihin. Tuloksista selvisi, että aktiivihiihtä oli selkeästi hyötyä pensashanhikeille, mutta aktiivihiihteen lisääminen sokerialustoihin ei auttanut silmuja selviytymään kuitenkaan merkittävässä määrin. Parempi tulos saatiin, kun annettiin silmujen olla aluksi kolme päivää aktiivihiihtimaljalla, jonka jälkeen suoritettiin sokerikäsittelyt.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

7.1. Tutkimustulosten tarkastelua

Kärkisilmut selvisivät kryokäsittelyistä noin 50 % paremmin kuin hankasilmut. Silmujen kokoluokista 2–3 mm pitkät kärkisilmut lähtivät kaikkein parhaiten uuteen kasvuun. 'Goldteppich'-lajikkeella melkein jokainen koe onnistui eikä selviytyminen ollut missään vaiheessa kriittistä. Tämän todistaa se, että kaikilla PVS2-käsittelyajoilla saatiin yli 20 %:n selviytyminen. Muut lajikkeet eivät selviytyneet yhtä hyvin.

'Goldteppich'-lajikkeella voi olla joitain eroja muihin pensashanhikkeihin tai sitten se on voinut saada esikasvatusalustasta merkittävää hyötyä muihin pensashanhikkeihin verrattaessa. 'Goldteppich'-lajikkeella käytettiin sakkaroosipohjaista esikasvatusalustaa, kun taas muilla pensashanhikeilla käytettiin fruktoosipohjaista alustaa. Maanantaina eristetyt silmut eivät lähteneet kasvuun yhtä hyvin kuin perjantaina eristetyt silmut. Lisäksi maanantaina eristetyille silmuille ei saatu tarpeeksi yhteneviä tuloksia, jotta olisi voitu kehittää silmujen maanantaisin eristämiseen perustuva menetelmä pensashanhikeille.

Perjantaina eristetyt silmut lähtivät kasvuun kaikilla lajikkeilla samansuuntaisesti ja PVS2-ajan pidentyessä saatiin parempia tuloksia. Perjantaina eristetyille silmuille käytettiin PVS2-käsittelyaikana 60:tä minuuttia, jolloin kolmella lajikkeella saavutettiin keskimääräisesti 40 % selviytyminen. 'Goldteppich'-lajikkeella ei testattu 60 minuutin PVS2-käsittelyaikaa perjantaina eristetyille silmuille, mutta jo 45 minuutin

PVS2-käsittelyajalla lajikkeen selviytyminen oli yli 80 %. Lisäkokeista saatiin selville, että alentamalla korkeinta käytettävää sokeripitoisuutta ja käyttämällä vain 0,50 M sakkaroosia saavutettiin 'Dart's Cream' -lajikkeella 60 minuutin PVS2-käsittelyajalla jopa 70–78 %:n kasvuunlähtö.

7.2. Tutkimustulosten luotettavuus ja pätevyys

Rinnakkaiset näytteet varmentavat saatua tulosta ja saadaan hieman selville tulosten vaihteluväliä. Jotta pystyttäisiin sanomaan jotain menetelmän tarkkuudesta, täytyisi rinnakkaisia näytteitä olla useampia. Tämän opinnäytetyön tavoitteena ei ollut määrittää menetelmän tarkkuutta, sillä se olisi vaatinut paljon enemmän kokeita ja aikaa. Menetelmän tarkkuuden määrittäminen ei lisäksi ole välttämätöntä, jos pystytään tietyllä varmuudella ja todennäköisyydellä esittämään menetelmä, jolla pensashanhikkejä voitaisiin säilyttää.

Toistettavuutta pystytään arvioimaan kokeilla, jotka on suoritettu täysin samalla menetelmällä ja täysin samalla tavalla. Ainut muuttuja on, että koe on suoritettu eri päivänä. Toistettavuudesta ei ole tehty paljon kokeita, koska työssä pyrittiin ensisijaisesti etsimään oikeaa toiminta-aluetta. Ei ole hyödyllistä toistaa koetta, josta on saanut huonot tulokset, sillä se ei auta oikean menetelmän löytämisessä. Toistettavuutta kannattaa tutkia vasta, kun on varma että menetelmä toimii ja saadaan haluttuja tuloksia kokeiden kasvuunlähdöistä.

Työssä oli useita mahdollisia virhelähteitä, joista yksi oli se, että oli runsaasti muuttujia. Muuttujia olivat esimerkiksi PVS2-aika, silmujen koko ja -tyyppi, silmujen eristämispäivä, sokerikäsittelyt ja aktiivihilikasittelyt. Suuri määrä muuttujia saa aikaan sen, että tuloksia on vaikea vertailla. Muuttujien runsaus voi johtaa pieniin virheisiin ja nämä pienet virheet vaikuttavat hieman esimerkiksi kuvaajiin.

Menetelmän muuttaminen oli välttämätöntä, koska menetelmällä ei aluksi saatu haluttuja tuloksia. Menetelmää piti muuttaa koko ajan kokeiden edetessä. Tämä johti siihen, että kaikilla lajikkeilla ei ollut aina yhtenäisiä muuttujia. Kokeita ei myöskään

suoritettu yhtä monta joka lajikkeella ja joillain lajikkeilla vastaavia kokeita ei suoritettu lainkaan. Kun alettiin saada haluttuja tuloksia, muuttujia pyrittiin vähentämään ja näin tuloksen täsmällisyyttä parantamaan. Esimerkiksi silmujen koko ja tyyppi olivat aluksi muuttujia, mutta ne saatiin kuitenkin melko nopeasti vakiinnutettua 2–3 mm pitkiksi kärkisilmuiksi.

Silmujen eristämispäivät vaihtelivat. Yhdellä koesarjalla eristämispäivä oli torstai, muilla koesarjoilla joko perjantai tai maanantai. Silmujen ottaminen on yksi tärkeimmistä vaiheista, ja se on syytä suorittaa oikein tai voi tapahtua hyvin suuri virhe. Jos havaittiin huonoja silmuja, ne poistettiin ennen kryokäsittelyä. Näin huonot silmut eivät päässeet vaikuttamaan lopulliseen tulokseen. Sillä jos olisi otettu kokeisiin jo valmiiksi huonoja silmuja, ne tuskin olisivat kestäneet kryokäsittelyä, tehtiin käsittely kuinka hyvin tahansa. Huonoja silmuja esiintyi todella vähän ja suurimmassa osassa koesarjoista niitä ei ollut lainkaan.

Silmut ovat elävää kasvusolukkoa ja on mahdotonta ajatella, että jos otetaan kymmeniä tai jopa satoja silmuja, niin kaikki silmut olisivat samanlaisia. Yhdestä pensashanhikin tuppaaasta saatiin keskimäärin kuusi kappaletta silmuja. Jotta saadaan 60 kappaletta silmuja, tarvitaan siis 10 kappaletta tuppaita. Pientä vaihtelua silmujen välille tulee varmasti, koska kaikki tupaat ja näin ollen myös eristetyt silmut eivät voi olla täysin samankaltaisia.

Yksi suurimmista muuttujista oli, annettiinko silmuille aktiivihiltä vai ei. Kaikille perjantain kokeille ja joillekin maanantain kokeille annettiin aktiivihiltä. Suurin osa maanantain kokeista ei saanut aktiivihiltä. Sokerien vaikutus oli myös todella suuri. Suurimmalla osalla kokeista sokerikäsittelyt tehtiin samalla menetelmällä. Poikkeuksena olivat kuitenkin ensimmäiset ja viimeiset kokeet.

Silmut voivat vaurioitua helposti eristämisen- ja siirtämisenvaiheissa. Silmujen siirrot pyrittiin tekemään samoihin aikoihin, jotta käsittelyajat pysyisivät samanpituisina. Maljalta erlenmeyerkolviin siirtämisessä on voinut tapahtua pientä virhettä. Liian aikaisessa vaiheessa siirretty verso ei selviä hengissä, vaan se ruskettuu ja kuolee. Tällaista virhettä on voinut tapahtua muutamissa kokeissa. Etenkin ensimmäisissä ja muutamissa muissa kokeissa havaittiin suurta versojen menettämistä, ja versovista silmuista ei

saatu hyviä versoja eikä viljelmää. On voinut tapahtua myös havainnointivirhe, jossa silmu havainnoitiin liian aikaisin versovaksi. Täytyy kuitenkin muistaa, että kryokäsittely on kasville melkoinen stressitekijä ja kaikki versovatkaan silmut eivät vain jaksa kasvaa viljelmiksi asti. Tästä johtuen versovien ja kasvuunlähdön välillä on pientä hävikkiä. Pääasiassa yli 70 prosenttia versovista lähti hyvin uuteen kasvuun ja niistä saatiin viljelämä aikaiseksi (liite 2.).

Vitrifikaatiokäsittely on monivaiheinen, ja siinä on paljon vaiheita joiden ajoitus on tarkkaa. Käsittelyajat saattoivat hieman venyä eri koesarjojen välillä. Ajoitusten pienoinen eriaikaisuus johtui todennäköisesti siitä, että käsiteltävän aineiston koko ja tyyppi vaihtelivat. Käsittelyaikojen venymiseen vaikutti paljon se, kuinka monta kryoputkea käsiteltiin kerralla. Myös käsiteltävien silmujen koko vaikutti käsittelyaikoihin, sillä pieniä silmuja oli vaikeampi siirrellä ja aikaa kului luultavasti kauemmin. PVS2-käsittelyaika vaikuttaa lisäksi suuresti silmujen selviytymiseen. Kerralla käsiteltävät silmumäärät pyrittiin pitämään pieninä, jotta PVS2-käsittelyaika ei venyisi turhan pitkäksi.

Saatua aineistoa oli yhdellä viikolla runsaasti ja niinpä kokeiltiin 20 silmun pakastusta yhteen kryoputkeen. Kaksinkertaisen määrän pakastus ei kuitenkaan antanut toivottavaa tulosta. Koe tehtiin maanantaina eristetyille silmuille 'Tervola'-lajikkeella. Tällä kyseisellä lajikkeella maanantaina tehdyt kokeet eivät onnistuneet normaalilla määrälläkään. Niinpä ei voida olla varmoja, johtuiko 20 kappaleen pakastuksen huono tulos vain silmujen määrästä vai maanantaina suoritetusta kokeesta. Mitä luultavimmin kuitenkin siitä, että silmut oli eristetty maanantaina.

Ensimmäisistä kokeista saatuihin tuloksiin on saattanut tulla kiireestä ja alun harjaantumattomuudesta sellaista virhettä, jota viimeisissä kokeissa tuskin on. Tämä virhe on niin sanottua tekijävirhettä. Muutamissa kokeissa oli myös eri henkilö havainnoimassa tai käsittelemässä silmuja. Tästäkin voi aiheutua pientä virhettä.

Kokeisiin on saattanut tulla hieman systemaattista virhettä lajikkeiden käsittelypäivämäärien vuoksi, minkä vuoksi samana päivänä käsiteltävien kokeiden tulokset olisivat saattaneet mennä samansuuntaisesti. 'Dart's Cream' ja 'Goldteppich' käsiteltiin keskenään samoina päivämäärinä ja 'Tervola' ja 'Elizabeth' taas keskenään samoina päi-

vämmärinä. Näyttäisi kuitenkin, että tällaista ei ole tapahtunut ja kaksi vahvempaa lajiketta ovat 'Tervola' ja 'Goldteppich' ja kaksi heikompaa taas 'Dart's Cream' ja 'Elizabeth'.

7.3. Menetelmäsuositus

Näiden kokeiden perusteella on laadittu pensashanhikeille seuraavanlainen menetelmäsuositus. Menetelmässä eristetään 4-viikkoisista *in vitro* -solukkolisäysviljelmistä perjantaina aktiivihiilimaljalle 2–3 mm pitkiä kärkisilmuja ja esikasvatetaan niitä kolme päivää, sitten ne siirretään yhdeksi päiväksi 0,25 M Murashige-Skoog-alustalle ja kahdeksi päiväksi 0,50 M Murashige-Skoog-alustalle. Korkeinta sokeripitoisuutta ei käytetä, vaan tämän jälkeen suoritetaan vitrifikaatiokäsittelyt käyttäen LS-käsittelyaikana 30:tä minuuttia ja PVS2-käsittelyaikana 60:tä minuuttia. 'Goldteppich'-lajikkeelle 60 minuuttia saattaa olla turhan pitkä aika ja jo 45 minuutin käsittelyllä saadaan hyvä tulos aikaiseksi. 'Goldteppich'-lajikkeella saatiin maanantain tuloksista 60 minuutin PVS2-käsittelyajalla aikaan 50 % kasvuunlähtö, niinpä voidaan siis olettaa, että perjantainakin 60 minuutilla lajike säilyy hengissä. Aikaa ei kannata ruveta kuitenkaan hirveästi pitkittämään yli 60 minuutin, koska pitempiä aikoja ei ole tutkittu ja versominen voi ruveta heikkenemään hyvin nopeasti 60 minuutin jälkeen.

7.4. Jatkotutkimukset

Muokattua menetelmää, jolla saatiin 'Dart's Cream'-lajikkeella parhaimmat tulokset, ei ole testattu muille pensashanhikeille. Jotta menetelmä voitaisiin ottaa käyttöön, täytyy se tutkia vielä tarkemmin useammalla lajikkeella. Jatkotutkimuksissa täytyy suorittaa riittävästi rinnakkais-, toisto- ja lajikekokeita. Rinnakkaiskokeilla voitaisiin tutkia menetelmän tarkkuutta, toistokokeilla taas menetelmän toistettavuutta ja lajikekokeilla lajikkeen vaikutusta menetelmällä saataviin tuloksiin.

Menetelmästä on kuitenkin saatu jo vakiinnutettua paljon muuntelevia tekijöitä ja näitä ei kannata jatkossa tutkia. Lisäksi on saatu selville aktiivihiihden merkitys ja korkeimman sokerin haittavaikutus silmuille. Ainoa perjantaina eristettyjen silmujen menetelmässä mahdollisesti muuttuva tekijä on PVS2-käsittelyaika, joka ei välttämättä ole optimissaan kaikilla lajikkeilla samalla ajalla. Korkea 60 minuutin aika näyttäisi kuitenkin toimivan käsittelynä ainakin kolmella lajikkeella.

Menetelmälle voitaisiin myös etsiä PVS2-aikaa, joka alkaa olla haitallista silmuille. Tämä ei kuitenkaan ole välttämätöntä, se auttaisi vain tietämään, liikutaanko lähellä riskialuetta, jossa silmut alkavat myrkyttyä.

Lisäksi esikasvatusalusta oli 'Goldteppich'-lajikkeella sakkaroosipohjainen, kun muilla lajikkeilla alusta oli fruktoosipohjainen. 'Goldteppich'-lajike selvisi kryokäsittelystä ja lähti versomaan selvästi paremmin verrattuna muihin pensashanhikkeihin. Voittaisiin siis tutkia, vaikuttaako sakkaroosipohjainen alusta vastaavasti myös toisilla lajikkeilla vai ovatko 'Goldteppich'-lajikkeen hyvä selviytyminen ja versominen esimerkiksi vain hyviä lajikeominaisuuksia.

Jos haluttaisiin eristää silmuja myös maanantaina, menetelmää pitäisi vielä kehittää, sillä maanantaina eristetyt silmut eivät selvinneet yhtä hyvin kuin perjantaina eristetyt. Maanantaina eristetyille silmuille kannattaa antaa aktiivihiihtä, koska se selkeästi parantaa versomista, mutta korkein sokerikäsittely voitaisiin sitä vastoin jättää pois kokeista.

LÄHTEET

Alanko, P. 2003. Koristepuut ja -pensaat: Kotipihan suosituimmat puuvartiset kasvit. Helsinki: Tammi.

Alanko, P., Joy, P., Kahila, P. & Tegel, S. 1997. Suomalainen Ruusukirja. 2. täyd. p. Helsinki: Tammi.

Bajaj, Y.P.S. 1995. Cryopreservation of plant germplasm I. 1. p. Springer. Kirjoitus julkaistu myös netissä Google kirjoissa. Viitattu 1.7.2009.

http://books.google.fi/books?id=Od089-J_nq0C&pg=PA28&dq=Cryopreservation+of+plant+germplasm+512.

Dereuddre, J., Fabre, J. & Bassaglia, C. 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. Plant Cell Reports 7 (3): 170–173.

Dumet, D., Engelmann, F., Chabrillange, N., Richaud, T., Beule, Durand-Gasselin, T & Duval, Y. 1993. Development of cryopreservation for oil palm somatic embryos using an improved process. Oléagineux 48 (6): 273–278.

Haapala, T. & Niskanen, A-M. 1992. Pohjoisten puuvartisten kasvien mikrolisäys. Helsinki: VAPK-kustannus.

Halmagyi, A. & Pinker, I. 2006. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84 (2): 145–153.

Havas, P. & Sulkava, S. 1987. Suomen luonnon talvi. Helsinki: Kirjayhtymä.

Kim, H.H., Cho, E.G. & Park, S.U. 2006. Analysis of factors affecting the cryopreservation of Garlic shoot tips. Journal of biochemical Nanotechnology 2 (2): 129–132.

Kryszcuk, A., Joachim, K., Grube, M. & Zimnoch-Guzowska, E. 2006. Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method. Journal of Food, Agriculture & Environment 4 (2): 196–200.

Marchand, P.J. 1996. Life in the cold: an introduction to winter ecology. 3. p. UPNE. Kirjoitus julkaistu myös netissä Google kirjoissa. Viitattu 29.8.2009.

<http://books.google.fi/books?id=gnSIxUEbwBUC&printsec=frontcover&dq=life+in+cold#v=onepage&q=&f=false>

Matsumoto, T., Sakai, A. & Yamada, K. 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Reports 13 (8): 442–446.

Matsumoto, T., Sakai, A. & Yamada, K. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41 (3): 237–241.

MTT:n internet sivut. Luettu 25.10.2009. www.mtt.fi
<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely>
<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely/tutkimusalat>
<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/mtt/mtt/esittely/tutkimusalat/kasvit>

Murashige, T & Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.

Niino, T., Sakai, A., Yakuwa, H. & Nojiri, K. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28 (3): 261–266.

Nukari, A., Rantala, S. & Uosukainen, M. 2008. Pitkääikaissäilytys kryomenetelmällä. Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote 23:4 p. Julkaistu MTT:n julkaisuissa. Viitattu 21.7.2009 www.smts.fi/mpol2008/index_tiedostot/Esitelmat/es106.pdf

Nukari, A., Uosukainen, M., Rokka, V-M., Antonius, K., Wang, Q. & Valkonen, J.P.T. 2009. Cryopreservation techniques and their application in vegetatively propagated crop plants in Finland. *Agricultural and Food Science* 18: 117–128.

Reed, B.M. 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. 1. p. Springer.

Räty, E. & Alanko, P. 2004. *Viljelykasvien nimistö*. Helsinki: Puutarhaliitto.

Räty, E & Taimistoviljelijät ry. 2005. *Viheralueiden puut & pensaat: 500 koristepuuta ja -pensasta sekä havukasvia*. Helsinki: Puutarhaliitto.

Sakai, A. & Yoshida, S. 1967. Survival of Plant Tissue at Super-Low Temperature VI Effects of Cooling and Rewarming Rates on Survival. *Plant Physiology* 42: 1695–1701.

Salonen, V. 2006. *Kasviekologia. Millaista on luonnonkasvien elämä?* Helsinki: WSOY oppimateriaalit.

Santh, R., Panis, B., Taylor, M. & Tyagi, A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92 (1): 107–111.

Tao, D. & Li, P.H. 1986. Classification of Plant Cell Cryoprotectants. *Journal of theoretical biology* 123 (3): 305–310.

Terävä, E. 2008. *Kasvianatomia*. Helsinki: Edita.

Uchendu, E.E. & Reed, B.M. 2008. A Comparative study of three cryopreservation protocols for effective storage of *in-vitro*-grown Mint (*Mentha* spp.) *Cryoletters* 29 (3): 181–188.

Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M. & Valkonen, J.P.T. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant cell Report* 24 (5): 280–288.

LIITTEET

Liite 1. Suomen kasvien menestymisvyöhykekartta



Liite 2. Koesarjat

KOESARJAT			
Kokeen selitys & (koe numero)	Eristetyt silmutyytit	Silmujen määrä	Kaikista versovista saatiin viljelmä prosentteina
1. 'Elizabeth'-koe (E1)	KS 2-3 mm KS 1-2 mm HS 1-2 mm	29 kpl 12 kpl 27 kpl	100 %
2. 'Elizabeth'-koe (E2)	KS 2-3 mm KS 1-2 mm HS 1-2 mm HS 0,5-1 mm	34 kpl 21 kpl 26 kpl 16 kpl	81 %
1. Goldteppich'-koe (G1)	KS 2-3 mm HS 1-2 mm	24 kpl 36 kpl	75 %
1. 'Dart's Cream'-koe (D1)	KS 2-3 mm HS 1-2 mm HS 0,5-1 mm	33 kpl 18 kpl 8 kpl	100 %
2. 'Goldteppich'-koe (G2)	KS 2-3 mm HS 1-2 mm HS 0,5-1 mm	31 kpl 30 kpl 17 kpl	97 %
2. 'Dart's Cream'-koe (D2)	KS 2-3 mm HS 1-2 mm HS 0,5-1 mm	31 kpl 21 kpl 9 kpl	100 %
3. 'Elizabeth'-koe (E3)	KS 2-3 mm HS 1-2 mm	60 kpl 60 kpl	73 %
4. 'Elizabeth'-koe (E4)	KS 2-3 mm HS 1-2 mm	30 kpl 29 kpl	100 %
1. 'Tervola'-koe (T1)	KS 2-3 mm HS 1-2 mm	60 kpl 60 kpl	100 %
2. 'Tervola'-koe (T2)	KS 2-3 mm	70 kpl	100 %
3. 'Goldteppich'-koe (G3)	KS 2-3 mm	60 kpl	98 %
3. 'Dart's Cream'-koe (D3)	KS 2-3 mm	60 kpl	100 %
4. 'Goldteppich'-koe (G4)	KS 2-3 mm	60 kpl	100 %
4. 'Dart's Cream'-koe (D4)	KS 2-3 mm	60 kpl	94 %
3. 'Tervola'-koe (T3)	KS 2-3 mm	60 kpl	96 %
5. 'Elizabeth'-koe (E5)	KS 2-3 mm	60 kpl	69 %
4. 'Tervola'-koe (T4)	KS 2-3 mm	44 kpl	100 %
6. 'Elizabeth'-koe (E6)	KS 2-3 mm	44 kpl	78 %
5. 'Dart's Cream'-koe (D5)	KS 2-3 mm	90 kpl	98 %
6. 'Dart's Cream'-koe (D6)	KS 2-3 mm	160 kpl	93 %
Yhteensä		1490 kpl	93 %

Liite 2. Koesarjat toteutusjärjestyksessä sekä kärki- (KS), että hankasilmujen (HS) kappalemäärät kokeittain. Kokeista saatu lopputulos esitetään versovista viljelmistä saatujen viljelmien prosenttiosuutena.

Liite 3. Käytetyt liuokset ja alustat

LS-liuos:

(ensimmäinen vitrifikaatioliuos)

Sisältää:

2 M glyserolia (184 g/l)
0,4 M sakkaroosia (137 g/l)
Murashige-Skoog-jauhetta (4,3 g/l) (Sigma Aldrich, Steinheim, Tuotenumero M5524)

Liuoksen pH on 5,8.

PVS2-liuos:

(toinen vitrifikaatioliuos)

Sisältää:

30 % glyserolia (300 g/l)
15 % etyleeniglykolia (150 g/l)
15 % dimetyylisulfoksidia (DMSO) (150 g/l)
Murashige-Skoog-jauhetta (4,3 g/l) (Sigma Aldrich, Steinheim, Tuotenumero M5524)
0,4 M sakkaroosia (137 g/l)

Liuoksen pH on 5,8.

1 M sakkaroosi liuos:

(purkuliuos, sulatettavien näytteiden pesuun)

Sisältää:

1 M sakkaroosia (342 g/l)
Murashige-Skoog-jauhetta (4,3 g/l) (Sigma Aldrich, Steinheim, Tuotenumero M5524)

Liuoksen pH on 5,8.

Murashige-Skoog-alustojen valmistukset pohjautuvat vuonna 1962 keksittyyn kasvatusalustaan, jonka keksivät Murashige, T & Skoog, F. Alkuperäinen artikkeli on nimeltään ”A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures” ja sen on julkaissut *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.

0,09 M sakkaroosi Murashige-Skoog-alusta jossa aktiivihiltä:
(aktiivihiiialusta)

Sisältää:

Murashige Skoog jauhetta (4,3 g/l) (Sigma Aldrich, Steinheim, Tuotenumero M5524)
vitamiineja (10 ml/l)
(Vitamiinit saadaan perusliuoksesta, jossa on nikotiinihappoa (0,0500 g/l), Tiamiinia (0,1000 g/l), pyridoksiinia (0,0500g/l) ja glysiiniä (0,2000 g/l).)
BAP (0,5 mg/l) (kasvuhormoonia)
IBA (0,05 mg/l) (kasvuhormoonia)
aktiivihiltä (2,5 g/l)
sakkaroosia (30 g/l)
gelriittiä (2,6 g/l)

Alustan pH on 5,6–5,8.

0,25 M, 0,5 M ja 0,75 M sakkaroosi Murashige-Skoog-alustat:
(sokerikäsitteyalustat)

Sisältävät:

Murashige Skoog jauhetta (4,3 g/l) (Sigma Aldrich, Steinheim, Tuotenumero M5524)
vitamiineja (10 ml/l)
(Vitamiinit saadaan perusliuoksesta, jossa on nikotiinihappoa (0,0500 g/l), Tiamiinia (0,1000 g/l), pyridoksiinia (0,0500g/l) ja glysiiniä (0,2000 g/l).)
myoinositolia (0,10 g/l)
gelriittiä (2,6 g/l)
Sakkaroosia alustoissa on eri määrät. 0,25 M-alustassa sakkaroosia on 85,50 g/l, 0,50 M-alustassa sakkaroosia on 171,00 g/l ja 0,75 M-alustassa sakkaroosia on 256,50 g/l.

Alustojen pH on 5,6–5,8.

0,25 M, 0,5 M ja 0,75 M sakkaroosi Murashige-Skoog-alustat joissa aktiivihiltä:
(maanantaina eristettyjen silmujen viimeisten kokeiden alustat)

Koostuvat kuten normaalit sokerikäsitteyalustat,
mutta kaikkiin on lisätty aktiivihiltä (2,5 g/l).

Alustojen pH on 5,6–5,8.

Fruktoosialusta:

(kaikkien pensashanhikkien vitrifikaatiokäsittelyn jälkeinen elvytysalusta ja 'Elizabeth', 'Dart's Cream' ja 'Tervola'-lajikkeiden esikasvusalusta)

Sisältää suoloja, jotka lisätään neljästä perusliuoksesta. Lisäksi alusta sisältää vitamiineja, kasvuhormooneja, sokeria, mesoinositolia ja agaria.

Ensimmäinen perusliuos sisältää:

NH_4NO_3 (16,5 g/l)
 KNO_3 (5 g/l)
 KH_2PO_4 (5 g/l)
 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (20 g/l)

Perusliuosta otetaan 50 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Toinen perusliuos sisältää:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ja Na_2EDTA (0,7800 g/l)

Perusliuosta otetaan 50 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Kolmas perusliuos sisältää: hivenaineita esim.

H_3BO_3 (0,6200 g/l)
 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,0250 g/l)
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l)
KJ (0,0830 g/l)

Perusliuosta otetaan 10 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Neljäs perusliuos sisältää:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (20,0000 g/l)
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l)
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,8600 g/l)
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (2,2300 g/l)

Perusliuosta otetaan 10 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Vitamiinit saadaan perusliuoksesta, jossa on nikotiinihappoa (0,0500 g/l), Tiamiinia (0,1000 g/l), pyridoksiinia (0,0500g/l) ja glysiiniä (0,2000 g/l). Vitamiiniperusliuosta otetaan 10 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Kasvuhormoonit BAP (100 mg/l) ja IBA (100 mg/l) liuotetaan 1 N NaOH liuoksiin. BAP liuosta otetaan 5 ml ja IBA liuosta 2,5 ml kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Litraan alustaa lisätään lisäksi:

fruktoosia (20 g/l)
mesoinositolia (0,1 g/l) (Sigma Aldrich, Steinheim, Tuotenumero 201-781-2)
agarjauhetta (4,5 g/l) (OneMed Oy, Vantaa, Tuotenumero1462076)
agarjauhetta (4,5 g/l) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Tuotenumero 4508.2)
Bacto-peptone (0,27 g/l) (Becton Dickinson and Company, Sparks USA, Tuotenumero 21152)

Alustan pH on 5,0.

Sakkaroosialusta:

(‘Goldteppich’-lajikkeen esikasvatusalusta)

Sisältää suoloja, jotka lisätään neljästä perusliuoksesta. Lisäksi alusta sisältää vitamiineja, kasvuhormoonia, sokeria, mesoinositolia ja agaria.

Ensimmäinen perusliuos sisältää:

NH_4NO_3 (33,0 g/l)
 KNO_3 (5 g/l)
 KH_2PO_4 (5 g/l)
 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (20 g/l)

Perusliuosta otetaan 50 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Toinen perusliuos sisältää:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ja Na_2EDTA (0,7800 g/l)

Perusliuosta otetaan 50 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Kolmas perusliuos sisältää: hivenaineita esim.

H_3BO_3 (0,6200 g/l)
 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,0250 g/l)
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l)
 KJ (0,0830 g/l)

Perusliuosta otetaan 10 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Neljäs perusliuos sisältää:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (20,0000 g/l)
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l)
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,8600 g/l)
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (2,2300 g/l)

Perusliuosta otetaan 10 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Vitamiinit saadaan perusliuoksesta, jossa on nikotiinihappoa (0,0500 g/l), Tiamiinia (0,1000 g/l), pyridoksiinia (0,0500g/l) ja glysiiniä (0,2000 g/l). Vitamiiniperusliuosta otetaan 10 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Kasvuhormoonia zeatiinia (10 mg/l) liuotetaan 1 N NaOH liuokseen. Liuosta otetaan 15 ml, kun valmistetaan 1 litra alustaa.

Litraan alustaa lisätään lisäksi:

sakkaroosia (20 g/l)
 mesoinositolia (0,1 g/l), (Sigma Aldrich, Steinheim, Tuotenumero 201-781-2)
 agarjauhetta (3,75 g/l), (OneMed Oy, Vantaa, Tuotenumero 1462076)
 agarjauhetta (3,75 g/l), (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Tuotenumero 4508.2)
 Bacto-peptone (0,27 g/l). (Becton Dickinson and Company, Sparks USA, Tuotenumero 21152)

Alustan pH on 5,0.

Liite 4. Kokeiden onnistuminen lajikkeittain

Perjantaina eristettyjen silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö prosentteina										
Selviytyminen (+LN kokeet) perjantai						Kasvuunlähtö (+LN kokeet) perjantai				
Pensashanhikkilajike	35 min	40 min	45 min	50 min	60 min	35 min	40 min	45 min	50 min	60 min
'Goldteppich'	100	100	90	x	x	80	89	90	x	x
'Tervola'	73	x	70-100	67-90	90	9	x	20-30	22-50	20-60
'Elizabeth'	x	x	70-80	91-100	100	x	x	0-30	27-30	30-56
'Dart's Cream'	80	90	27-90	x	70-100	10	0	0-60	x	20-60
Selviytyminen (-LN kokeet) perjantai						Kasvuunlähtö (-LN kokeet) perjantai				
Pensashanhikkilajike	35 min	40 min	45 min	50 min	60 min	35 min	40 min	45 min	50 min	60 min
'Goldteppich'	100	100	100	x	x	100	89	60-80	x	x
'Tervola'	100	x	80	100	100	56	x	30	78	70
'Elizabeth'	x	x	90	100	80	x	x	0	30	20
'Dart's Cream'	100	89	90	x	90	20	11	0-20	x	40

Maanantaina eristettyjen silmujen selviytyminen ja kasvuunlähtö prosentteina										
Selviytyminen (+LN kokeet) maanantai						Kasvuunlähtö (+LN kokeet) maanantai				
Pensashanhikkilajike	35 min	40 min	45 min	50 min	60 min	35 min	40 min	45 min	50 min	60 min
'Goldteppich'	x	x	70-82	90-91	67-90	x	x	60-64	60-91	33-60
'Tervola'	x	28-53	x	73	45	x	0-11	x	0	9
'Elizabeth'	x	x	67-78	45	64	x	x	0-11	18	36
'Dart's Cream'	x	x	64-67	70-100	50-60	x	x	0-9	0-60	0-10
Selviytyminen (-LN kokeet) maanantai						Kasvuunlähtö (-LN kokeet) maanantai				
Pensashanhikkilajike	35 min	40 min	45 min	50 min	60 min	35 min	40 min	45 min	50 min	60 min
'Goldteppich'	x	x	100	89	90	x	x	100	78	90
'Tervola'	x	30	x	73	91	x	0	x	0	9
'Elizabeth'	x	x	80	100	73	x	x	10	36	36
'Dart's Cream'	x	x	70	100	100	x	x	0	44	30
Värien selite		Värit								
paras selviytyminen +LN										
paras selviytyminen -LN										
paras kasvuunlähtö +LN										
paras kasvuunlähtö -LN										

Liite 5. Kasvuunlähdöt lajikkeittain

KS 2-3 mm kasvuunlähtöjen vertailuja PVS2 aikojen ja silmujen ottamis päivämäärien mukaan					vastaavien kokeiden (-LN) kokeet		Huom!
lajike ja koesarja	silmujen otto-päivä	PVS2-aika	(+LN) kokeiden kasvuunlähtö		(-LN) kokeiden kasvuunlähtö		
G1	pe	45 min	2/12	17 %	8/10	80 %	kokeen tulos hylättiin
G2	ma	45 min	13/21	62 %	9/9	100 %	
G3	pe	35 min	8/10	80 %	10/10	100 %	
G3	pe	40 min	8/9	89 %	8/9	89 %	
G3	pe	45 min	9/10	90 %	6/10	60 %	
G4	ma	50 min	16/21	76 %	7/9	78 %	
G4	ma	60 min	9/19	47 %	9/10	90 %	
T1	pe	35 min	1/11	9 %	5/9	56 %	
T1	pe	45 min	5/20	25 %	3/10	30 %	
T2	ma	40 min	2/56	4 %	0/10	0 %	
T3	pe	50 min	7/19	37 %	7/9	78 %	
T3	pe	60 min	8/20	40 %	7/10	70 %	
T4	ma	50 min	0/11	0 %	0/11	0 %	
T4	ma	60 min	1/11	9 %	1/11	9 %	
E1	to	45 min	2/18	11 %	9/10	90 %	-sokeri
E2	ma	45 min	3/21	14 %	4/10	40 %	-sokeri
E3	pe	45 min	4/30	13 %	0/10	0 %	
E4	ma	45 min	1/18	6 %	1/10	10 %	
E5	pe	50 min	6/21	29 %	3/10	30 %	
E5	pe	60 min	9/19	47 %	2/10	20 %	
E6	ma	50 min	2/11	18 %	4/11	36 %	
E6	ma	60 min	4/11	36 %	4/11	36 %	
D1	pe	45 min	3/23	13 %	2/10	20 %	
D2	ma	45 min	1/20	5 %	0/10	0 %	
D3	pe	35 min	1/10	10 %	2/10	20 %	
D3	pe	40 min	0/10	0 %	1/9	11 %	
D3	pe	45 min	0/10	0 %	0/10	0 %	
D4	ma	50 min	6/20	30 %	4/9	44 %	
D4	ma	60 min	2/20	10 %	3/10	30 %	
D5	ma	45 min	6/17	35 %	5/9	56 %	0,5 M korkein sokeri + aktiivihiiltä ma kokeessa
D5	ma	45 min	3/19	16 %	4/10	40 %	0,75 M korkein sokeri + aktiivihiiltä ma kokeessa
D6	pe	45 min	10/20	50 %	2/10	20 %	
D6	pe	60 min	8/20	40 %	4/10	40 %	
D6	pe	45 min	13/20	65 %	9/10	90 %	0,5 M korkein sokeri
D6	pe	60 min	14/19	74 %	7/10	70 %	0,5 M korkein sokeri
D6	pe	45 min	10/20	50 %	2/10	20 %	
D6	pe	60 min	8/20	40 %	4/10	40 %	

Liite 5. Käytetyt lajikkeet pensashanhikkilajikkeille olivat G='Goldteppich', T='Tervola', E='Elizabeth' ja D='Dart's Cream'. Lajikekoodien jälkeiset numerot osoittavat kyseisellä lajikkeella suoritettavien koesarjojen lukumäärän.